Aus der II. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses
— Berlin Neukölln —
Dir. Ärztin: Professor Dr. med. I. Boll

PHASENKONTRASTKINEMATOGRAPHIE VON KNOCHENMARK-STAMMZELLEN BEIM MENSCHEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
H.-M. Sommer
aus Helmstedt

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533901_0014

Aus der II. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses

- Berlin Neukölln -

Dir. Ärztin: Prof. Dr.med.I. Boll

Phasenkontrastkinematographie von Knochenmark- Stammzellen beim Menschen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

H.-M. Sommer

Referent: Professor Dr. I. Boll
Korreferent: Professor Dr. Merker

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am 18. März 1976

EINLEITUNG

Zu Anfang des 2o. Jahrhunderts prägte NAEGELI den Begriff des Myeloblasten in der Auseinandersetzung mit den Autoren der Unitariergruppe (MAXIMOW, GRAWITZ). Er bekannte sich damit zu einer dualistischen Ansicht bezüglich der Entstehung der Blutzellen, denn er trennte erstmals die frühen Vorstufen der Granulozyten von den Lymphozyten ab. Seitdem sind von beiden Richtungen viele Ergebnisse veröffentlicht worden, ohne daß es bis jetzt zu einer endgültigen Einigung bezüglich der Stammzelle der Leukozyten gekommen wäre.

So bereitet die Differenzierung der frühesten determinierten Formen der Granulo- und Monopoese- der Myeloblasten und der Monoblasten- auf der einen Seite und der Lymphozyten auf der anderen Seite erhebliche Schwierigkeiten, die im ungefärbten Phasenkontrastbild nicht geringer sind als im gefärbten Präparat. Die Unterscheidung der Lymphozyten von den Myeloblasten nach morphologischen Kriterien ist so schwierig, daß amerikanische Untersuchergruppen (McCULLOCH, METCALF et al.), meinen, die granulopoetisch determinierte Stammzelle nur funktionell bestimmen zu können.

Hingegen hatte schon RICH et al. 1939 über unterschiedliche Bewegungsformen der Myeloblasten von den Lymphozyten berichtet. Andere Autoren haben dies offenbar nicht bestätigt: RIND beschreibt in seinem Atlas bezüglich der Myeloblasten lediglich eine Beweglichkeit ohne Ortsveränderung (Typ II).

BESSIS gesteht der Stammzelle überhaupt keine eigene Beweglichkeit zu. Da nach BOLL (1966) nur Zellen mit Lokomotion ins Blut übertreten - s.a. Heilmeyer im Handbuch für Innere Medizin 1952 - blieben frühere Beschreibungen von Stammzellvorkommen im peripheren Blut ohne Erklärungsmöglichkeit.

Bezüglich der Beweglichkeit der Lymphozyten besteht auch keine einhellige Meinung. Diese Zelle wird von RIND als eine relativ unbewegliche Zelle beschrieben ohne Angabe von einer Fortbewegungsgeschwindigkeit. BESSIS spricht auf der anderen Seite von einer sehr beweglichen Zellart und gibt eine Geschwindigkeit von 33 µm/min. an, wobei er sich auf eine Angabe von DeBRUYN (1946) bezieht. KEMPS fand jedoch 1968 eine erheblich niedrigere Wanderungsgeschwindigkeit von etwa 8 µm/min.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Stammzelle der Monozyten. RIND schreibt auch ihr - dem Monoblasten- eine gewisse ortsständige Beweglichkeit zu, während BESSIS überhaupt keine Monoblasten differenziert, sondern sie dem Pool der Myeloblasten zuordnet.

Die Morphologie dieser drei Zelltypen ist bei RIND, BESSIS und STOBBE ausführlich im ungefärbten Ausstrich und im Phasenkontrast beschrieben worden. Verlaufsbeobachtungen mit Reifung der Myebblasten zu Promyelozyten und der Monoblasten zu Promonozyten konnten die Zuordnung dieser Stammzellen bestätigen (BOLL 1973). In dieser Arbeit wurden diese morphologischen Kriterien zur Differenzierung im Phasenkontrastbild herangezogen.

Die Kulturtechnik auf dem Plasmagerinnsel erlaubt, die Zellen bis zu 3 Tagen unter der Beobachtung vital zu erhalten. Die Phasenkontrastmikroskopie eignet sich besonders gut für die Lebendbeobachtungen, da die nativen Zellen mit ihren Strukturelementen und Bewegungen klar und kontrastreich zur Darstellung gelangen. Mit Hilfe der Kinematographie sind Bewegungsabläufe beliebig reproduzierbar. Sie sind damit eindeutiger zu interpretieren: Veränderungen können zeitlich besser zugeordnet werden, langsam ablaufende Vorgänge werden durch eine Zeitrafferreinrichtung deutlicher, einzelne Bilder können zur graphischen Darstellung verwandt werden.

Bemerkungen zur Lokomotion

Die aktive Fortbewegung aller Leukozytenarten wird von vielen Autoren beschrieben (AMBROSE, SENDA, v.PHILIPSBORN, HIRAKI, WEED). Die Potentialdifferenz zwischen dem intakten und dem geschädigten Gewebe ist für eine Bewegungsrichtung einer wandernden Blutzelle verantwortlich. Über den Mechanismus der Fortbewegung werden jedoch noch mehrere Theorien diskutiert. Einmal werden Veränderungen der adhäsiven Kräfte der Zelle angenommen (v.PHILIPSBORN, BAUDISCH, BECKMANN, AMBROSE, PROJAN, BACIGALUPO). In der Leukergie sieht FLECK das Auftreten von aktiven Vorgängen an der Oberfläche der Leukozyten, das er als Antwort auf Schwankungen im biologischen Gleichgewicht in Form verstärkter Aggregation deutet. Im Zusammenhang mit der Umwandlung von intra-

zellulären Strukturen als Gel- Sol- Umwandlung werden die Änderungen der Oberflächenpotentiale als Erklärung für die Fortbewegung herangezogen (STOBBE, STOCKEM, RICHTER, WOHLFAHRT- BOTTERMANN), während RAMSEY speziell für die Leukozyten keinen Anhalt für eine solche Veränderung des Zytoplasmas findet. LETTERER und SENDA vermuten, daß die Änderung der elektrischen Struktur der Zellmembran einen Impuls für die Aktivität der ultramikroskopischen kontraktilen Elemente darstellen. Sie weisen auf die fibrillären Strukturen des Zytoplasmas hin und geben so eine neue Erklärung der Lokomotion. Ein weiteres Indiz für das Vorhandensein von kontraktilen Elementen ist der Wechsel von Erschlaffung und Kontraktion der weißen Blutzellen im Ablauf ihrer Lokomotion. Nach Gabe von ATP steigern die Leukozyten ihre Aktivität - ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein fibrillärer Elemente, die auf ATP als Energieauslöser ansprechen (SENDA, RIDDLE, TAMURA, FRANKS, KEYSERLINGK, LETTERER). Nach Gabe von ACTH findet ALBRECHT eine Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Ansäuerung des Mediums. RAMSEY stellt eine erhöhte Geschwindigkeit durch die Anwesenheit einer Bakterienkolonie fest (Chemotaxis).

Die Fortbewegung geschieht mit besonderen Organellen-Pseudopodien, Cilien oder undulierenden Membranen. Die Blisterbildung ist kein Ausdruck der Zellfortbewegung und darf nicht mit der uniloculären Ausbildung von Pseudopodien in Zusammenhang gebracht werden. Sie ist lediglich der Ausdruck von regel-

losen Zytoplasmaausstülpungen zur Vergrößerung der Zelloberfläche (BESSIS).

Aus der von ihnen nachgewiesenen hohen Oberflächenspannung schliessen MARSHALL und SENDA auf die Fähigkeit der Myeloblasten zur aktiven Fortbewegung, ohne diese jedoch beobachtet zu haben. Die Reifung der Myeloblasten zum Granulozyten ist u.a. durch eine Reduktion der negativen Ladung charakterisiert. Die hohe negative Oberflächenladung der Promyelozyten und Myelozyten verhindert den Kontakt der Zelle mit den umgebenden Zellen oder anorganischen Substanzen. Sie zeigen wenig Adhäsion, Aggregation und Lokomotion und sind in ihrer Form ziemlich rigide und wenig verformbar, ohne jedoch gänzlich unbeweglich zu sein (WEED). LICHTMANN und WEED sehen in der Rigidität und mangelnden Verformbarkeit der Zellen die Ursache für das Verbleiben der sich entwickelnden Zellen in den Knochenmarksinus. Durch die Reifung und die damit verbundene Verminderung der negativen Oberflächenladung kann sich eine Zelle später besser verformen. Durch Verflüssigung des Zytoplasmas ist eine leichtere Bildung von Pseudopodien möglich entsprechend der Sol-Gel-Theorie von WOHLFAHRT-BOTTERMANN.

Ziel dieser Arbeit ist, in den humanen Knochenmark- Kulturen die Lebensäußerungen der unreifsten determinierten Stammzellen der Granulopoese und der Monopoese sowie der Lymphozyten mit Hilfe der kinematographischen Verlaufsbeobachtungen im Phasenkontrast zu

beschreiben. Größenmessungen sollen das Bild der Zellmorphologie und der Kinetik vervollständigen.

METHODE UND MATERIAL

Das aus Knochenmarkspunktionen gewonnene Zellmaterial wurde zu Kulturen nach der Carrelschen Deckglasmethode in einer Modifikation nach Boll (1966) auf dem hängenden Koagulumtropfen angelegt. Als Kulturmedium wurde ein Koagulumtropfen auf einem Objektträger benutzt, der aus 5o% Nativplasma des jeweiligen Patienten, 1o% Cor-Hormon(R) dreifach verstärkt der Fa. Chemiewerke Homburg und 4o% Hanks Lösung bestand. In letzter Zeit wurde mit besserem Erfolg anstatt Hanks Lösung 4o% autologes Serum benutzt. Nach Gerinnung des Koagulumtropfens wurden Knochenmarkbröckchen aufgesetzt und mit einem kleinen Serumtröpfchen bedeckt. Über dem ganzen wurde ein Hohlschliffobjektträger mit Vaseline befestigt. Das fertige Präparat wurde am Deckglasrand mit flüssigem Hartparaffin verschlossen. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37^{o} inkubiert.

Die Lebendbeobachtung der Zelle wurde in einer sogenannten "platten Kultur" durchgeführt. Dazu wurden die Zellen aus der Koagulumkultur (s.o.) mit einer Deckglas-ecke in einer dünnen Schicht möglichst frei von Flüssigkeit auf einem flachen, sonst wie oben beschriebenen Koagulumtropfen gesetzt, mit einem Deckgläschen, das leicht angedrückt wurde, bedeckt und mit Paraffin abgedeckt. Je flacher die planparallele Kammer war, desto besser stellten sich die Zellinnenstrukturen dar. (Deshalb wurde auch nicht der sonst übliche Hohlschliffobjektträger über einen normalen Objektträger verwandt, sondern

flache Deckgläschen). Aus den unterschiedlichen Bedingungen (Andruck des Deckgläschens, Koagulumdicke, wellige Oberflächenbeschaffenheit) resultierte ein jeweils unterschiedlicher Abstand zwischen Objektträger und Deckgläschen von Präparat zu Präparat. Die Zellen wurden 1 - 2 Stunden nach der Knochenmarkspunktion im Mikroskop zur Beobachtung eingestellt. Die Verlaufsbeobachtungen der Knochenmarkzellen wurden im Phasenkontrastmikroskop bei 7o- und 1oo- facher Vergrößerung (Ölimersion) durchgeführt. Es wurden zwei Mirkoskope der Fa. Leitz "Laborlux", ein Zeiss "Opton" sowie ein Zeiss "Standart WL" verwandt. Gefilmt wurde mit einer Kamera Bolex H 16 mit einem 16 mm Schwarz- Weiß- Negativfilm. Diese Aufsatzkamera wurde über eine Zeitraffereinrichtung der Fa. Kindervater, Berlin- Neukölln, geschaltet. Zur Beleuchtung dienten leistungsstarke Nierdervoltlampen, da das Licht von Quecksilberdampflampen die Zellen schädigt. Die Belichtung erfolgte automatisch, die Belichtungszeit betrug 1/2 bzw. 1/4 sec, je nach zu erwartender Aktivität der Zellen wurden Aufnahmen in Abständen von 1o - 2o sec. gemacht. Die Temperatur in den Mikroskopwärmeschränken wurde automatisch bei 37° C gehalten.

Die Auswertung der entwickelten und copierten 16 mm- Positivfilme erfolgte mit dem HKS- Filmbetrachter mit dem Einzelbildzähler der Fa. Hünemörder, Eßlingen, nach dem Filmprotokoll. Der fest installierte Bildschirm gab das Bild in 1ofacher Vergrößerung wieder. Zu Beginn der Beobachtung bzw. des Zeichnens wurde das Bild scharf

eingestellt, später wurde nichts mehr verändert. Von der Projektionswand wurde das Bild der Zelle genau abgepaust (Zellumrisse, Kern, ev. zusätzliche intrazelluläre Strukturen). Während der Kern durch eine deutlich sichtbare Kernmembran abgegrenzt wurde, lag die Zellgrenze im Bereich eines Lichthofes (PIND, 1963), war also im Phasenkontrastmikroskop nicht tatsächlich darstellbar. Da wir sie vereinbarungsgemäß am inneren Rand des Lichthofes zeichneten, erhielten wir naturgemäß eine etwas zu kleine Zellfläche, jedoch mit konstantem Fehler.

Jede gezeichnete Zelle wurde dann drei-mal planimetriert, um den Meßfehler beim Planimetrieren durch einen Mittelwert der drei Messungen möglichst gering zu halten. Um die für jedes Mikroskop unterschiedliche Vergrößerung genau festzustellen, wurde ein Maßstab mitgefilmt. Wir erhielten dadurch einen für jedes Mikroskop unterschiedlichen Multiplikationsfaktor für den Planimeterwert. Aus dieser Berechnung ergab sich der tatsächliche Flächenwert der Zellen bzw. der Kerne: Wir verwendeten die Größenordnung μm^2 als Bezugssystem, da es nicht möglich war, aus dem planimetrierten Flächenwert eine Volumenberechnung anzustellen. Die Zellen lagen ja nicht in abgekugeltem Zustand dem Deckgläschen auf, sondern sie waren unterschiedlich flach ausgebreitet. Lediglich Mitosezellen hatten etwa eine Kugelform. Die Zelle bzw. der Kern waren immer dann am schärfsten einzustellen, wenn sie möglichst flach dem Deckgläschen anlagen unter einer dünnen Flüssigkeits-

schicht. Dann war auch der Phasenkontrasthof am schmalsten, während der Hof in der Mitose am breitesten war, was auch gleichzeitig mit der Zunahme der Unschärfe für eine Dickenzunahme der Zelle sprach.

Für die photographischen Abbildungen wurden mit Hilfe des Bildbetrachters einzelne Negative aus der laufenden Beobachtung herausgesucht. Diese wurden erneut photographiert, und von diesen Negativen wurden nun die Positive abgezogen. Dies geschah mit unterschiedlichen Vergrößerungsmaßstäben, so daß nun auf jeder Abbildung der gleiche Maßstab für jeweils 1o µm gilt. In dieser Arbeit wurden insgesamt 78 Stammzellen sowie 53 Lymphozyten untersucht. Das Zellmaterial wurde zum ganz überwiegenden Teil bei Knochenmarkpunktionen gewonnen, einiges aus Pleurapunktionen und aus einem Leukozytenkonzentrat. Neben völlig normalem Knochenmark kamen im Beobachtungsgut folgende Diagnosen vor:

Panmyelopathie	anger.Erythropoese
Plasmozytom	Thyreotoxikose
perniziöse Anämie	M. Waldenstroem
sidero-achrest.Anämie	Erythämie
Blutungsanämie	Polyzytämia vera
entzündl.veränd.KM	Thalassämie
reakt. Lymphknoten-Schwellung	Collumcarzinom
M. Hodgkin	M. Boeck

Stammzellen aus Knochenmarkpunktionen leukämischer Erkrankungen wurden nicht mit in die Beobachtungen einbezogen. Die Beobachtungsdauer war sehr unterschiedlich. Sie reichte von

ca. 1 Stunde bis zu 7o Stunden. Verlaufsmessungen bezüglich einer Größenzunahme wurden nicht durchgeführt.

Unterschieden wurden in dieser Arbeit drei Zelltypen: Myeloblasten, Monoblasten und Lymphozyten. Hierbei wurde auf folgende Parameter das Hauptaugenmerk gerichtet:
Größe der Zelle
Größe des Zellkerns
Kern- Plasma- Relation
Morphologie von Zelle und Kern
Bewegungsformen - Zellverformungen
Bewegungsabläufe
Fortbewegungsgeschwindigkeit.

ERGEBNISSE

Myeloblasten

Morphologie

Zur Differenzierung der Myeloblasten wurden die morphologischen Kriterien herangezogen, wie sie von RIND, STOBBE und BESSIS beschrieben worden sind, und die von BOLL durch Beobachtungen der Transformation in Promyelozyten bestätigt werden konnten: Im Phasenkontrastbild stellt sich der Myeloblast als kleine, meist runde Zelle dar. Der Kern ist durch eine gut sichtbare Kernmembran vom Zytoplasma abzugrenzen. Seine Form ist meist ebenfalls rund, gelegentlich eingebuchtet oder auch unregelmäßig verformt. Im Kerninneren finden sich 1 - 3 dunkle Nucleoli, über den Kern verteilen sich einige Flecken mittlerer Phasenpositivität. Das Zytoplasma weist bis auf wenige Granula (z.B. Mitochondrien)(RIND) keine Strukturen auf und stellt sich relativ homogen grau dar. Wenn eine Kernbucht vorhanden ist, finden sich die Granula gehäuft in dieser Region und zeigen hier auch die größte Beweglichkeit.

Größenmessungen

Insgesamt werden 38 Myeloblasten ausgemessen. Dabei kommen wir zu folgenden Ergebnissen (s.Tab. 1 + 2): Bei den planimetrischen Messungen der Zellgröße ergibt sich eine durchschnittliche Größe von $81{,}0\,\mu m^2 \pm 27{,}4\,\mu m^2$ für das gesamte Beobachtungsgut. Eine weitere Unterteilung in sessile und bewegliche Zellen ergibt für die sessile Zelle einen Durchschnittswert von $81{,}5\,\mu m^2$ bei 16 Zellen und für die bewegliche Zelle einen Wert von $80{,}6\,\mu m^2$ (22 Zellen).

Bei den Kerngrößen finden sich in den einzelnen Gruppen nicht solch große Varianten. Im Gesamtmittel beträgt die Kernfläche 43,99 μm^2 ± 22,2 μm^2, die sessile Zelle hat dabei eine Kernfläche von 42,79 μm^2, wohingegen die bewegliche Zelle den etwas größeren Kern mit einer Fläche von 44,89 μm^2 besitzt.

Aus den planimetrierten Flächenmessungen errechnen wir den Kern- bzw. Zelldurchmesser.

Die Zelldurchmesser liegen im Gesamtmittelwert bei 1o,o5 μm, die sessilen Zellen haben einen Durchmesser von 1o,o4 μm, die beweglichen haben einen Durchmesser von 1o,o6 μm.

Ein ähnliches Verhalten ergibt sich aus den Werten für den Kerndurchmesser. Auch hier sind die sessilen Zellen mit dem etwas kleineren Zelldurchmesser vertreten von 7,26 μm, die beweglichen Zellen liegen bei 7,51 μm, insgesamt ergibt sich ein Mittelwert von 7,41 μm für den Durchmesser der Kerne.

Aus diesen teils planimetrisch - teils rechnerisch ermittelten Werten ergeben sich dann die Werte für die Kern- Plasma- Relationen von Fläche bzw. Durchmesser.

Die Werte für die ersten liegen bei o,54 ± o,o3 für die Gesamtzahl, o,52 für die sessilen Zellen und o,56 für die beweglichen. Die Durchmesserrelation liegt für beide Gruppen noch näher beieinander, nämlich o,73 ± o,o7 für die Gesamtzahl, o,72 für die sessilen und o,74 für die beweglichen Zellen.

Bei der Aufteilung der einzelnen Zellen in Kernklassen nach LEIBETSEDER ergibt sich folgendes Verteilungsmuster (s.a. Übersichtstabellen II + III):

Tabelle 1

Myeloblasten Bewegungstyp I + II

N		Zellfläche μm^2	Kernfläche μm^2	Zelldurchmesser μm	Kerndurchmesser μm	Kern-Plasma-Relation	Kern-Pl.Durchm.-Relation	Kernklasse
1	53/791	99,8	65,1	11,28	9,11	o,65	o,8o	1/2
2	/2657	142,3	68,9	13,46	9,37	o,48	o,7o	1
3	/2657	151,8	77,4	13,91	9,93	o,51	o,67	1
4	/2658	87,3	39,6	1o,54	7,1o	o,45	o,67	1/4
5	/2661	51,6	28,4	8,11	6,o1	o,55	o,74	1/4
6	/2661	61,5	32,7	8,85	6,45	o,53	o,73	1/4
7	/2662	56,25	24,75	8,46	5,62	o,44	o,66	1/8
8	/2666	5o,25	3o,o	8,oo	6,18	o,6o	o,77	1/4
9	/2666	72,3	44,1	9,6o	7,49	o,61	o,78	1/2
10	/2666	7o,5	41,25	9,47	7,25	o,59	o,77	1/4
11	158/21oo	1o3,5	53,3	11,48	8,24	o,51	o,72	1/2
12	66/1490 1494 1498	76,5	33,o	9,87	6,48	o,43	o,66	1/4
13	21/ 264 265	78,2	45,o	9,98	7,57	o,57	o,76	1/2
14	229/2189 2191	95,2	45,o	11,o1	7,57	o,47	o,69	1/2
15	229/2211	46,2	22,3	7,67	5,32	o,48	o,69	1/8
16	229/2211	62,3	33,8	8,91	6,56	o,54	o,74	1/4

(Filme, bei denen der vordere Teil der Film-Nr. fehlt, waren noch nicht endgültig archiviert.)

Tabelle 2

N		Myeloblasten Bewegungstyp III							
		Zellfl. μm^2	Kernfl. μm^2	Zelldurchm. μm	Kerndurchm. μm	Kern-Plasma-Relation	Kern-Plasma-Durchm-Relation	Geschwindigkeit μm/min.	Kernklasse
17	6o/1965	64,1	45,15	9,o4	7,58	o,7o	o,84	1,76	1/2
18	6o/1965	58,9	4o,9	8,66	7,22	o,69	o,83	o,97	1/4
19	182/2o38	96,3	62,1	11,o7	8,89	o,64	o,8o	2,25 o,93	1/2
2o	47/2287 229o	71,8	42,4	9,56	7,35	o,59	o,77	1,98	1/2
21	131/2466	87,o	42,o	1o,52	7,31	o,48	o,69	2,23	1/2
22	6o/2654	11o,25	56,25	11,85	8,46	o,51	o,71		1/2
23	158/21o1	77,6	46,2	9,94	7,67	o,59	o,74	3,83	1/2
24	158/21o1	72,1	45,9	9,58	7,65	o,64	o,8o	8,o9	1/2
25	158/2o98	6o,6	32,3	8,79	6,41	o,53	o,73	o,62 1,27 o,61	1/4
26	158/2o98	68,4	42,1	9,33	7,32	o,62	o,78	1,29 1,6	1/2
27	7o/1677	92,25	48,o	1o,84	7,82	o,52	o,72	1,96 o,52	1/2
28	7o/1677	1o9,5	57,75	11,81	8,58	o,53	o,73		1/2
29	7o/2111	111,75	57,75	11,93	8,58	o,52	o,73	1,89 1,57 1,5	1/2
3o	51/16o5	5o,31	21,93	8,oo	5,29	o,44	o,66	1,9	1/8
31	51/16o5	52,46	26,66	8,17	5,83	o,51	o,71		1/8
32	31/2614	82,77	39,68	1o,27	7,11	o,48	o,69	2,84	1/4
33	31/2614	77,19	38,44	9,92	7,oo	o,5o	o,71	1,34	1/4
34	131/2111	92,25	46,5	1o,84	7,7o	o,5o	o,71	1,13	1/2
35	7o/1918	12o,75	63,o	12,4o	8,95	o,52	o,69	2,47 3,26 2,31	1/2
36	131/2433	85,5	48,o	1o,44	7,82	o,56	o,75	o,79	1/2
37	131/2457	63,24	36,27	8,98	6,8o	o,57	o,76	1,47	1/2
38	131/2457	68,82	48,36	9,36	7,85	o,7o	o,74	1,7	1/2

Über die Häfte der Zellen (55,27%)haben eine Kernklasse von K 1/2, etwas mehr als ein Viertel hat die Kernklasse K 1/4 (28,95%), während K 1/8 nur noch mit einem Anteil von 1o,52 % vertreten ist. Verschwindend geringe Anteile hat K 1 mit 5,26%. (Absolute Zahlen s. Übersichtstabellen II und III).

Bewegungsformen

Bei der Beurteilung der Bewegungsformen und -typen wird von der Klassifizierung ausgegangen, wie sie von RIND bezüglich der Lymphozyten beschrieben worden sind (Bewegungstypen I - III). Zum besseren Verständnis seien hier noch einmal die Beurteilungskriterien aufgeführt:

Typ I

Sessile Zelle ohne Konturveränderungen, keine Zytoplasmaprojektionen, weitgehend starre Zelloberfläche, keinerlei Lokomotion.

Typ II

Konturveränderungen, flüchtige Zytoplasmaprojektionen, die nach verschiedenen Richtungen ausgebildet werden ohne erkennbares Ziel, noch keine Lokomotion, Ausbildung von Pseudopodien.

Typ III

Pseudopodienbildung, teilweise erhebliche Formveränderungen von Kern und Zelle, eindeutige Fortbewegung. Der Bewegungsablauf geht von der ruhenden Zelle über die Pseudopodienbildung bis zur Lokomotion mit anschließendem Rückgang der Aktivität bis wieder zum Ruhestadium.

Der Myeloblast ist eine relativ bewegliche Zelle, wie schon aus dem niedrigen Prozentsatz sessiler

Zellen abgelesen werden kann. Es kommen dabei sehr unterschiedliche Bewegungsformen zur Beobachtung, wobei der Geschwindigkeit eine entscheidende Bedeutung für die Formvarianten zuzukommen scheint.

Der Bewegungstyp I entspricht in seinen morphologischen Kriterien der oben beschriebenen Zelle, definitionsgemäß fehlen ihm typische Bewegungen (Bild 1).

Beim Bewegungstyp II bildet die Zelle schmale bis spitze Zytoplasmafortsätze aus, die schnell erscheinen und auch genau so schnell wieder eingezogen werden können, und die an allen Stellen der Zelloberfläche gebildet werden können (Abb. 6,7,8, davon 6 + 7 mit Pinozytose). Auch breite Pseudopodien können gesehen werden (Abb.3). Weiter werden Kernrotationen sowie starke Zellkontraktionen und langsam über die Zelle hinweglaufende Kontraktionsringe beobachtet (Abb.2,4,5).

Beim Bewegungstyp III können sehr unterschiedliche Bewegungsformen beobachtet werden, wobei die langsame Fortbewegung bei Myeloblasten am häufigsten vorkommt. Er bleibt dabei im wesentlichen abgerundet (Abb.7,8). Auch bei diesen Zellen können über die Zelle hinweglaufende Kontraktionen gesehen werden, die der Zelle teilweise eine fast wurmartige Form verleihen (wie auch bei RICH et.al). In mehreren Beobachtungen kann auch eine rollend- schaukelnde Fortbewegung gesehen werden, die jedoch nur im Laufbild des Films zur Darstellung zu bringen ist. Zytoplasmafortsätze können sowohl an der Vorder- als auch an der Rückseite der Zelle abgebildet werden (Abb.8),sie sind meistens schwach phasenpositiv.

Die Mitrochondrien sind immer im rückwärtigen Teil der Zelle enthalten. Bei der schnellen Fortbewegung nehmen die Myeloblasten eine sehr kegelförmige Gestalt an, die im Einzelbild der Handspiegelform des Lymphozyten ähneln kann (Abb.9). Dabei läuft die Zelle jedoch meistens mit der Spitze vorweg im Gegensatz zum Lymphozyten. Häufig bildet die Zelle an ihrer führenden Seite eine zarte, meist spitze undulierende Membran aus, die keine Zelleinschlüsse enthält. Der Kern nimmt an den Formveränderungen meist nicht teil, vereinzelt kommt es zu einer Elongation (Abb.9).

Durch einen relativ häufigen Richtungswechsel ohne erkennbaren Grund macht die Fortbewegung der Myeloblasten einen ungerichteten, ziellosen Eindruck (Abb.7 - 9).

Geschwindigkeiten

Für die Gesamtzahl der 22 in Fortbewegung befindlichen Myeloblasten (57,9%) wird eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 1,91 µm/min gemessen. Dabei wird bei der einzelnen Zelle ebenfalls von einer Durchschnittsgeschwindigkeit ausgegangen ohne zu berücksichtigen, daß auch bei einer Zelle die Geschwindigkeit durchaus wechseln kann. Die schnellste Zelle hat dabei eine Geschwindigkeit von 8,09 µm/min, die langsamste legt nur 0,28 µm/min zurück. Wegen der unterschiedlichen Beobachtungsdauer kann nichts über die Zeitspanne der Ruhe- und der Bewegungsphase der einzelnen Zelle ausgesagt werden. Es läßt sich lediglich feststellen, daß der Fortbewegung eine meist längere Zeit gesteigerter ortsständiger Aktivität (Typ II) vorausgeht.

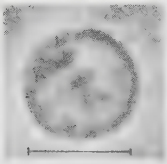


Abb.Nr. 1: Typischer Myeloblast in Ruhe (Bewegungstyp I). Runder Zelleib mit relativ dichtem homogenen Zytoplasma, welches sich in schmalem Saum um den Kern verteilt. Der Kern enthält zwei verwaschene Nucleoli und ist an einer Stelle etwas eingebuchtet. An dieser Stelle finden sich im Zytoplasma vereinzelt Granula. (Tab.Nr. 11, aus normalem KM, Film Nr.158/2100 Objektivvergrößerung 100x).

X)

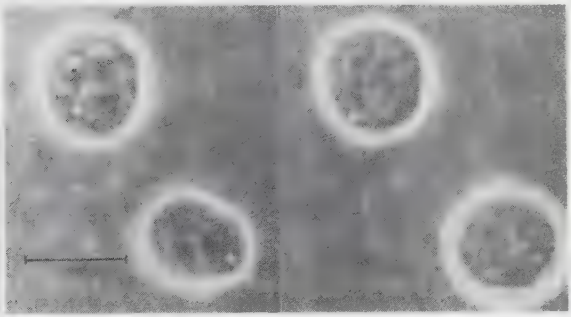


Abb.Nr. 2: Zwei Myeloblasten, von denen sich der untere im linken Bildteil stark kontrahiert, während der obere in Ruhe verbleibt (Tab.Nr.17, aus KM bei Polyzytämia vera, Film Nr.60/1965, Objektivvergrößerung 100 x).

X) Der Maßstab auf den Bildern gibt jeweils 10 µm an. Die langen Pfeile geben die Bewegungsrichtung an. Die in den Bildlegenden angegebenen Vergrößerungen geben die jeweilige Mikroskopvergrößerung an.

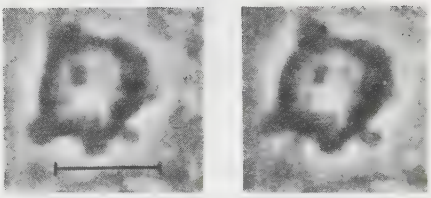


Abb.Nr. 3: Kleiner Myeloblast vom Bewegungstyp II mit starker Oberflächenaktivität durch Pseudopodienbildung ohne Beteiligung des Kerns und des Kernkörperchens (Tab.Nr.14, aus KM bei M. Waldenstroem, Film Nr.229/2189-91, Objektivvergrößerung 7ox).

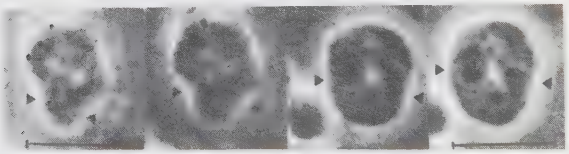


Abb.Nr. 4: Myeloblast mit langsam von unten nach oben über den Zelleib wandernder Kontraktionswelle (Bew.Typ II).(+ aus KM bei Thalasämie, Film Nr. 47/2287-9o, Objektivvergrößerung 7ox).

+) nicht gemessen wegen unscharfer Kernmembran

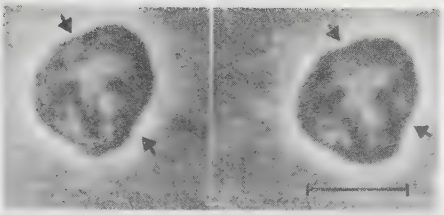


Abb.Nr. 5: Typischer kleiner Myeloblast mit wechselnden Kontraktionsringen zwischen den Pfeilen (Bew.Typ II). (Aus KM bei sec. Tumorzeichen, Film Nr.121/246, Objektivvergrößerung 70x).

Abb.Nr. 6: Kleiner Myeloblast mit zarten Pinozytosemembranen und sehr starker Oberflächenaktivität (Bew.Typ II). (Tab.Nr.34, aus normalem KM, Film Nr.131/2111, Objektivvergrößerung 70x).

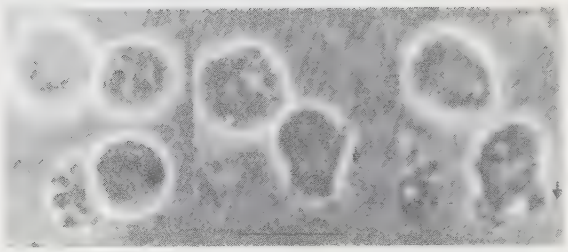


Abb.Nr. 7: Über einer degenerierten Zelle zwei Myeloblasten, von denen sich einer (2.Teilbild) auf den unteren Bildrand zubewegt, während der andere in Ruhe verbleibt. Die zugespitzte Zellseite führt, die Granula sind im hinteren Zellteil gesammelt. Am vorderen Zellteil ist eine starke Oberflächenaktivität sichtbar, die sich in Pinozytosefiguren und Blistern darstellt.(+, aus normalem KM, Film Nr. /2671-78, Objektivvergrößerung 1oox).

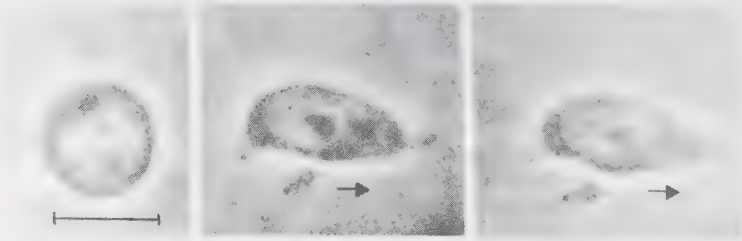
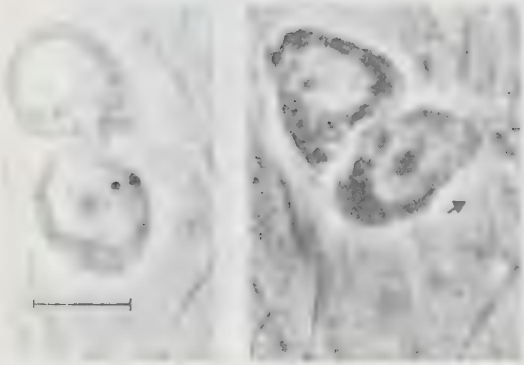
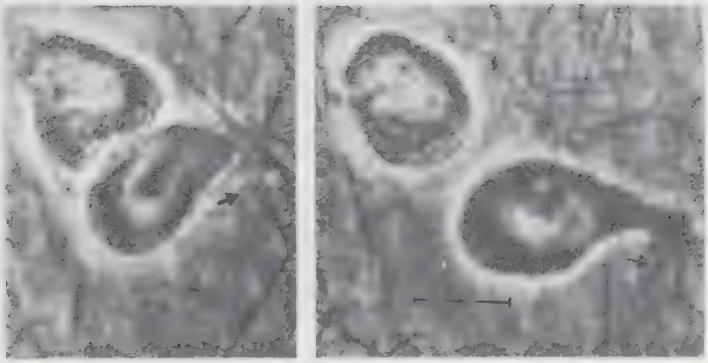
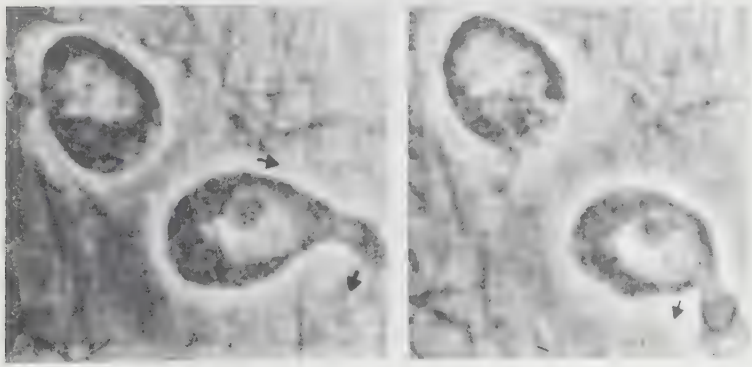


Abb.Nr. 8: Myeloblast, zunächst abgerundete Ruheform; darauf folgende Elongation und Fortbewegung mit einem spitzen Zytoplasmaausläufer voran. Der Kern flacht sich deutlich ab. (Tab.Nr.27, aus KM bei Megakaryozytopenie, Film Nr.7o/1677, Beobachtungsdauer 8o sec., Objektivvergrößerung 7ox).

\+ nicht gemessen







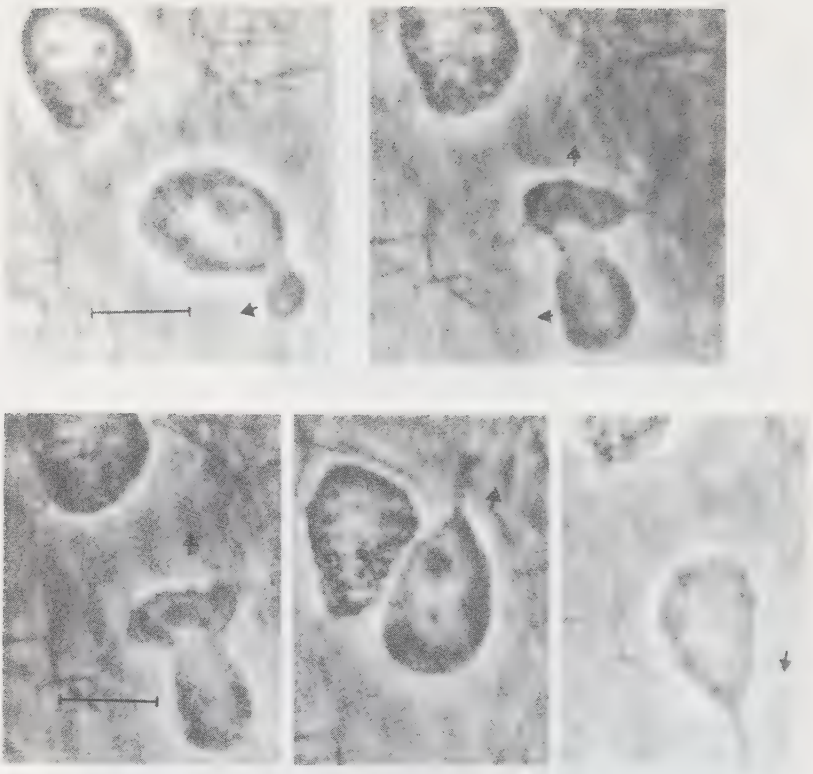


Abb.Nr. 9: Oben kleiner Granuloblast, unten Myeloblast, der sich nach zunächst abgerundeter Ruhephase in typischer Weise fortbewegt (Typ III). Die Zelle und der Kern elongieren sich. Es bildet sich eine spitze Pseudopodie als vorderer Zellteil aus (Pfeile geben Bewegungsrichtung an). Später (2.Reihe) erfolgt eine Schwenkung der Pseudopodie, wobei auch der Kern in den Fortsatz ragt. Danach (3.Reihe) erfolgen zwei schnell aufeinanderfolgende Bewegungen mit unterschiedlicher Richtung, erst nach unten, dann nach oben, jeweils mit spitzen Zytoplasmaausläufern als führenden Zellteil und mit Kerndeformierung. Im letzten Teilbild (5.Reihe) kehrt die Zelle noch einmal um. (Tab.Nr.35, aus normalem KM, Film Nr.7o/1918, Beobachtungsdauer 65', Objektivvergrößerung 7ox).

Monoblasten

Morphologie

Die Monoblasten ähneln im Phasenkontrastbild in ihrer Kern-Plasma-Relation den Myeloblasten, sie sind jedoch deutlich größer (s.u.). Der Kern ist häufiger gekerbt bis gelappt, zuweilen nur leicht eingebuchtet. Er enthält eine fleckige bis streifige Chromatinstruktur, meist sind ein bis zwei dunkle, dichte Nucleoli zu erkennen. Das Zytoplasma ist relativ homogen grau und enthält mehrere kleine dunkle Granula, die Mitochondrien, die sich im gesamten Zytoplasma ausbreiten. Das Zytozentrum - wenn als solches überhaupt zu erkennen - bleibt von ihnen ausgespart, sie gruppieren sich bestenfalls darum herum. Sehr häufig können Zytoplasmaausstülpungen beobachtet werden - die Blister -, die wie Tropfen oder auch Fahnen aus der sonst glatt begrenzten Zelle herausgestreckt werden.

Größenmessungen

Es werden insgesamt 39 Monoblasten ausgemessen, die Meßwerte liegen dabei relativ weit auseinander (s.Tab. 3 + 4).

Die Zellen haben eine durchschnittliche Fläche von $152{,}2\,\mu m^2 \pm 38{,}2\,\mu m^2$, wobei die beweglichen Zellen im Gegensatz zu den Myeloblasten die im Durchschnitt etwas größeren sind als der Gesamtdurchschnitt mit einem Mittelwert von $156{,}7\,\mu m^2$, die Zellen vom Bewegungstyp I und II haben einen Mittelwert von $149{,}9\,\mu m^2$ für die Zellfläche.

Bei den Kerngrößen ergibt sich ein umgekehrtes Bild. Während hier die Zellen vom Typ III eine durchschnittliche Kerngröße von $83{,}4\,\mu m^2$ haben,

sind die anderen Zellkerne mit einer Fläche von 85,8 μm^2 die größeren. Im Gesamtmittel ergibt sich hier ein Flächenwert von 84,o μm^2 ± 28,6 μm^2.

Wie auch schon vorher werden aus diesen Werten die anderen Größen rechnerisch ermittelt.

Für den Zelldurchmesser der Monoblasten ergibt sich ein Gesamtmittelwert von 13,8 μm, die beweglichen Zellen haben einen Durchmesser von 14,o8 μm, die sessilen Zellen einen von 13,69 μm. Die Kerne werden, obwohl sie nicht immer so abgerundet sind wie die der Myeloblasten, als abgerundet angenommen, um auch für sie den Durchmesser bestimmen zu können. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Kerngruppen sind dabei relativ gering. So haben die beweglichen Zellen den etwas kleineren Zellkern mit 1o,27 μm, die unbeweglichen haben einen Durchmesser von 1o,37 μm. Der Gesamtmittelwert liegt bei 1o,3o μm.

Die Kern-Plasma-Relation liegt für alle Zellen ziemlich dicht beieinander. Die Zellen vom Typ III haben eine Relation von o,55, die andere Gruppe eine von o,58 bei einem Gesamtverhältniswert von o,57 ± o,o6 für die Zellflächenrelation.

Die Durchmesserrelationen liegen noch dichter beisammen mit einer Abweichung von o,o1 nach oben bzw. unten. Es ergibt sich ein Gesamtwert von o,74 ± o,o8, die beweglichen haben eine Relation von o,73, die unbeweglichen von o,75 für die Kern-Plasma-Durchmesser-Relation.

Zur Größeneinordnung werden auch hier wieder die Kernklassen der Zellen nach LEIBETSEDER bestimmt.

Tabelle 3

Monoblasten Bewegungstyp I + II

N		Zellfl. μm^2	Kernfl. μm^2	Zelldurchmesser μm	Kerndurchmesser μm	Kern-Plasma-Relation	Kern-Plasma-Durchmesser-Relation	Kernklasse
1	124/2469	167,4	96,1	14,6	11,1	o,57	o,76	1
2	14o/1o34 1o38	196,7	1o7,o	16,o	11,7	o,53	o,73	2
3	185/1793	164,3	1o5,4	14,4	11,6	o,64	o,8o	1
4	185/1797	93,o	58,9	1o,9	8,7	o,63	o,79	1/2
5	/2423 /2427	137,6	6o,2	13,2	8,8	o,43	o,66	1/2
6	217/1477	15o,1	97,6	13,7	11,2	o,65	o,8o	1
7	22o/2oo3	127,1	68,2	12,7	9,4	o,54	o,74	1
8	22o/2oo3	124,o	55,8	12,6	8,5	o,45	o,67	1/2
9	22o/2592 2596	127,5	6o,o	12,7	8,8	o,47	o,69	1/2
1o	124/1438	127,o	74,4	12,7	9,7	o,58	o,76	1
11	173/1884 1888	155,3	89,7	14,2	1o,7	o,58	o,75	1
12	159/1781	138,o	95,o	13,3	11,o	o,69	o,82	1
13	42/415	292,2	197,5	19,3	15,9	.o,67	o,82	4
14	42/1953 1958	114,7	52,7	12,1	8,2	o,46	o,67	1/2
15	172/1566	145,7	8o,6	13,6	1o,2	o,56	o,75	1
16	229/2211	195,o	12o,o	15,7	12,4	o,62	o,78	2
17	229/2211	2o2,o	12o,o	16,1	12,4	o,6o	o,77	2
18	229/2211	12o,o	75,o	12,4	9,8	o,62	o,79	1
19	229/221o 2213	1o5,o	6o,5	11,6	8,8	o,58	o,75	1/2
2o	/19o4	93,o	65,1	1o,9	9,1	o,7o	o,83	1/2
21	66/541	155,o	77,5	14,1	9,9	o,48	o,7o	1
22	229/221o 2211 2213	125,o	79,5	12,6	1o,2	o,64	o,81	1
23	7o/1345	151,5	79,4	13,8	1o,2	o,52	o,73	1
24	/1915	1o1,9	73,1	11,4	9,8	o,72	o,85	1
25	116/1581	187,5		15,3				
26	116/1581	2o2,o	97,5	16,o	11,1	o,48	o,69	1/2

Tabelle 4

Monoblasten Bewegungstyp III

N		Zellfl. μm^2	Kernfl. μm^2	Zelldurchmesser μm	Kerndurchmesser μm	Kern-Plasma-Relation	Kern-Plasma-Durchmesser-Relation	Geschwindigkeit μm/sec.	Kernklasse
27	172/1650	178,7	91,1	15,08	10,7	0,51	0,71	1,0	1
28	159/1781	190,9	107,5	15,59	11,7	0,56	0,75	0,4 0,4	2
29	165/1604 1607	176,1	96,1	14,97	11,6	0,55	0,74	0,9 2,0	1
30	153/1520	186,6	92,5	15,41	10,85	0,50	0,70	5,7 5,2 6,7 2,5	1
31	206/233 234	185,2	90,7	15,36	10,72	0,49	0,70	3,3	1
32	206/233 234	144,7	75,0	13,57	9,77	0,52	0,72	1,2	1
33	206/233 234	154,5	80,2	14,2	10,11	0,52	0,72	1,2	1
34	273/2622 2626 2629 2630	147,7	83,1	13,71	10,29	0,56	0,75	--	1
35	220/2003	135,2	75,6	13,12	9,81	0,56	0,75	1,0 1,2	1
36	131/240	147,2	85,6	13,69	10,44	0,58	0,76	0,5	1
37	174/1904 1906	115,9	68,2	12,15	9,32	0,59	0,77	0,2	1
38	230/2568 2573 2576	126,0	60,0	12,66	8,74	0,48	0,69	1,7	1/2
39	66/902	148,5	78,7	13,75	10,01	0,53	0,73	1,0 1,5	1

Hier zeigt es sich, daß die Kernklasse 1 mit 63,16% (24 Zellen) den ganz überwiegenden Teil der Zellen enthält. Die zweitgrößte Gruppe ist die Kernklasse K 1/2 mit 23,68% (9Zellen). Die begrenzenden Klassen sind K2 mit 1o,53% und K 4 mit 2,63%. Interessant ist es, daß der Anteil der Kernklasse K 1 bei den Zellen vom Bewegungstyp III noch höher ist als bei dem gesamten Kollektiv. Fast alle Zellen, nämlich 84,6%, haben diese Kerngröße. K 1/4 Zellen kommen nicht mehr vor.

Bewegungsformen

Die Formveränderungen, die der Monoblast während der Fortbewegung durchmacht, sind teilweise noch einschneidender als die der Myeloblasten, teilweise sind es die gleichen wie die bei den Myeloblasten beobachteten.

Beim Bewegungstyp II ist insgesamt eine etwas schwächere Oberflächenaktivität festzustellen als bei den Myeloblasten. Nur selten werden hier Zellkontraktionen beobachtet, langsam über die Zelle hinlaufenden Kontraktionsringe und schwach phasenpositive Blister an der Zelloberfläche nach verschiedenen Seiten. Deutlich häufiger sind jedoch zarte, spitze undulierende Membranen mit Pinozytose zu beobachten. (Abb.1o,11,13,14,15).

Bei den Zellen vom Bewegungstyp III scheint die Geschwindigkeit eine ähnliche Rolle zu spielen wie bei den Myeloblasten. Je langsamer eine Zelle läuft, desto abgerundeter bleibt sie. Die Bewegung hat dabei einen amöboid-kriechenden Charakter (Abb.17). Bei den schnelleren Zellen können sehr viel häufiger Zytoplasmaaustülpungen gesehen werden.

Handspiegelformen kommen ebenfalls nicht zur Beobachtung. Die Pseudopodien unterscheiden sich nur wenig von denen der Myeloblasten. Sie sind entweder spitz oder zackig, dabei phasenkontrastnegativ mit einer dunklen Umrandung. Die Membranen an der Vorderseite (im Bezug auf die Fortbewegungsrichtung) sind zart und flüchtig. Der Führungsteil ist teilweise spitz zulaufend, teilweise abgerundet. Vereinzelt werden schaukelnde Bewegungen gesehen, an denen der Kern ebenfalls teilnimmt, wie überhaupt der Kern an den Zellverformungen viel stärker teilnimmt. Seine Rotationen sind teilweise sehr heftig (Abb.12,14,15). Der Lauf der Zelle ist ebenfalls offenbar ungerichtet, durch rasch wechselnde Führungsteile der Zelle entsteht ein Zick-Zackkurs (Abb.16).

Geschwindigkeiten

Von den 39 beobachteten Monoblasten sind insgesamt 13 bewegliche Zellen vom Typ III, was einem Prozentsatz von 33% entspricht.. Fast alle anderen Zellen sind teilweise vom Bewegungstyp II. Für die Monoblasten wird eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 1,98 µm/min. gemessen. Die langsamste Zelle ist o,4 µm/min schnell, die schnellste hat eine Geschwindigkeit von 6,7 µm/min. Auch für diese Zellen gilt das für die Myeloblasten gesagte bezüglich der Aktivitäten vor der Lokomotion.

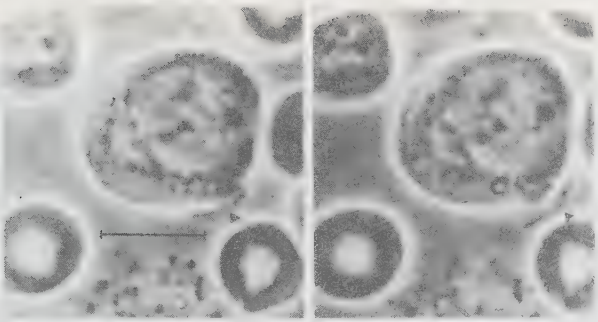


Abb.Nr.1o: Monoblast, relativ ruhig mit nur vereinzelter Oberflächenaktivität (Bew.Typ II) in Form von kurz herausgeschleuderten Zytoplasmafähnchen. In der Nähe zwei Glanzkörner. Viele Granula und Mitochondrien, besonders um das Zytozentrum herum gruppiert. Drei gut sichtbare Nucleolen im zart strukturierten Kern.(Tab.Nr.27, aus KM bei angeregter Erythropoese,, Film Nr. 172/165o, Vergrößerung 1oox).

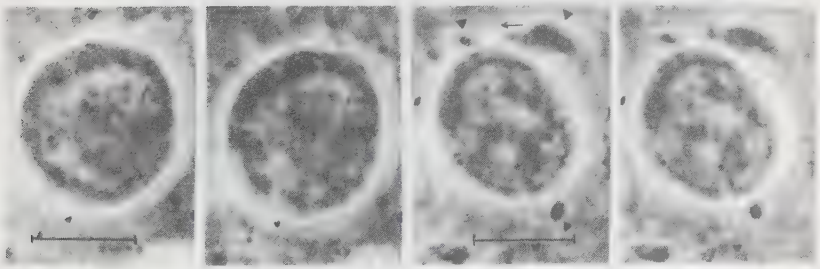


Abb.Nr.11: Abgerundeter Monoblast, der zunächst etwas auseinanderläuft, sich dann aber kontrahiert und unter Ausbildung von Blistern, deren Zusammenhang mit der Zelloberfläche durch den Phasenkontrasthals überdeckt wird, sich langsam nach oben fortbewegt (Bew.Typ III). (Tab.Nr. + , aus KM bei Histiozytose, Film Nr.159/25o1-o2, Beobachtungsdauer 2', Vergrößerung 1oox).

+ Archivbild

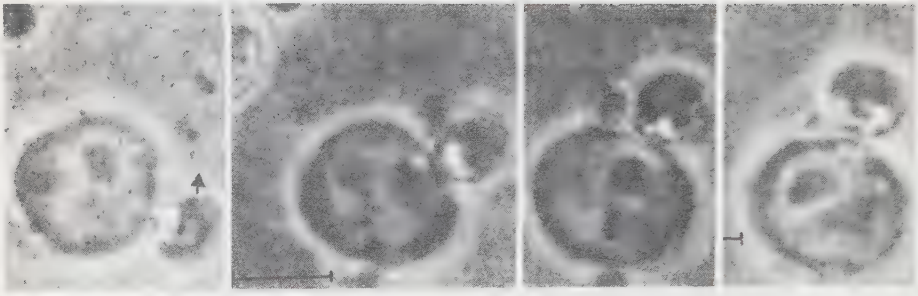
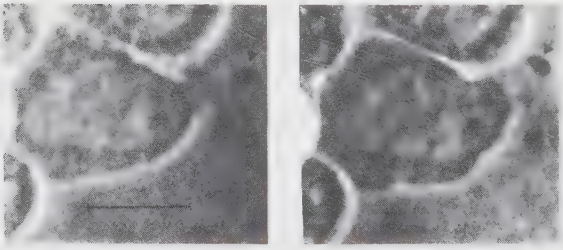
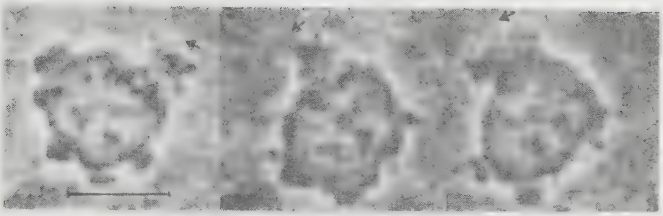


Abb.Nr.12: Monoblast, der langsam nach unten wandert und dabei mit Kern rotiert, am Zytoplasmabürzel gut zu erkennen. (Tab.Nr.38, aus KM bei M. Hodgkin, Film Nr.23o/2568-73-76, Beobachtungsdauer 4o', Objektivvergrößerung 7ox).



Ab..Nr.13: Großer Monoblast vom Bew.Typ II, der rechts einen schmalen Blister ausbildet, der zeitweise abgeschnürt scheint, später aber wieder eingezogen wird. Im Zytoplasma Mitochondrien; der Kern ist strukturiert mit 1 Nucleolus. (Tab.Nr.29, aus KM bei Eisenmangelanämie, Film Nr.165/16o4-o7, Objektivvergrößerung 1oox).



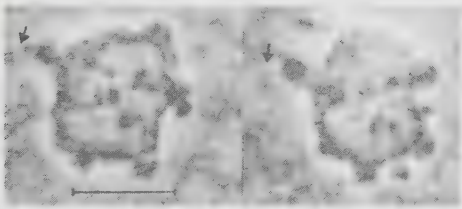


Abb.Nr. 14: Monoblast in deutlicher Rotationsbewegung. Als Fixpunkt wird ein Zytoplasmafortsatz mit vielen Granula gewählt, der während der ganzen Drehung relativ formkonstant bleibt. Hier zusätzlich noch mehrere Zytoplasmafortsätze. (Tab.Nr. 3o, aus KM bei Anämie, Film Nr. 153/152o, Beobachtungsdauer 1o', Vergrößerung 1oox).

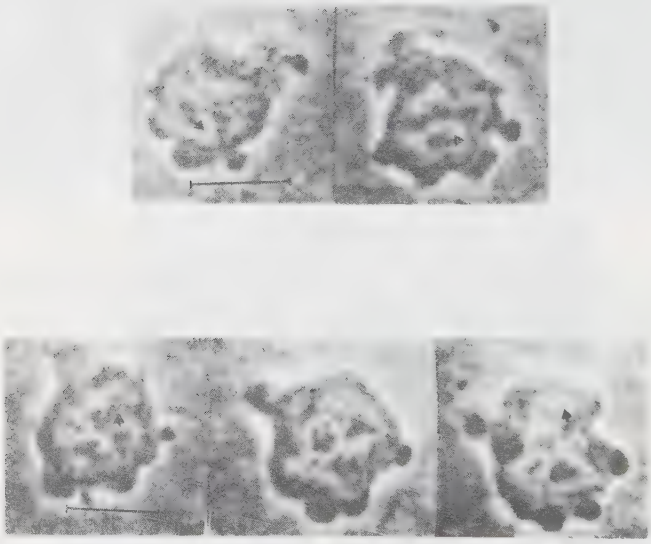


Abb.Nr.15: Gleiche Zelle wie Nr.14, die Rotation wird diesmal am Kern demonstriert. Sie wird am besten sichtbar bei dem relativ formkonstanten Nucleolus.

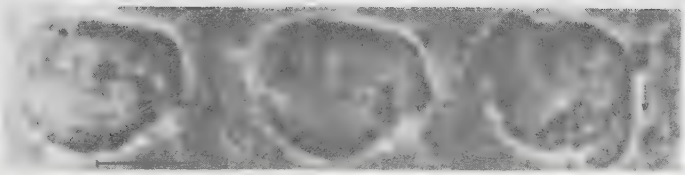


Abb.Nr.16: Monoblast vom Bew.Typ III mit stark gebuchtetem Kern. Zunächst ist nur Pinozytose zu sehen (Pfeil), später (Teilbild 3) hat sich eine zarte Führungsmembran ausgebildet. Im vorderen Zellteil haben sich die Granula am Zytozentrum angesammelt, während der Zellkern sich im hinteren Zellteil befindet. Diese bildet noch in derselben Minute auch Pinozytosefortsätze aus und zieht die Zelle in die entgegengesetzte Richtung. (Tab.Nr.15 ,aus KM bei Schilddrüsenkarzinom, Film Nr.172/1566, Beobachtungsdauer 1', Objektivvergrößerung 1oox).

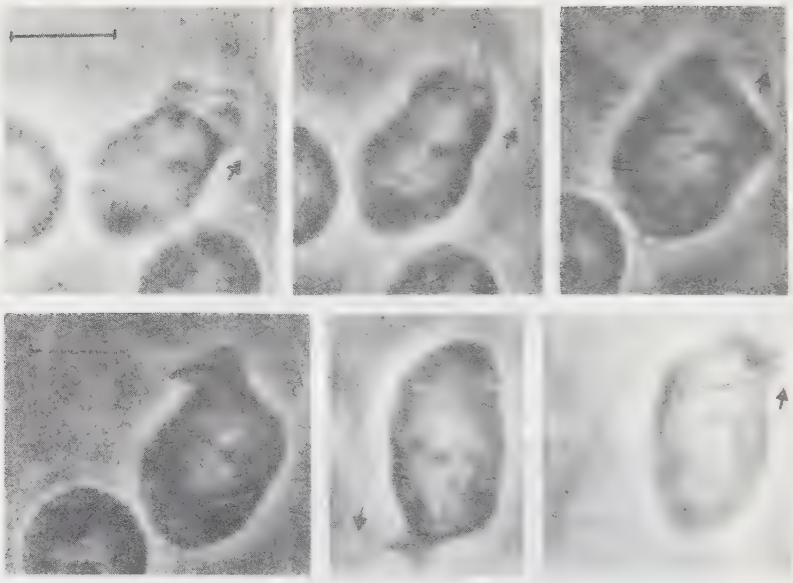


Abb.Nr.17: Gruppe von drei Monoblasten, von denen sich einer in für Monoblasten typischer Weise fortbewegt. Nach Ausbildung einer zarten, nicht deutlich ausgeprägten Führungsmembran und einer Kontraktionswelle läuft die Zelle unter Beibehaltung ihrer elongierten Form nach oben, wobei der führende Teil nicht immer die gleiche Form behält, fast immer ist jedoch eine Spitze sichtbar. (Tab.Nr.33, aus KM bei Infektionszeichen, Film Nr.2o6/233-34, Beobachtungsdauer 6', Objektivvergrößerung 7ox).

Lymphozyten

Morphologie

Der Lymphozyt stellt sich in der Phasenkontrastbeobachtung dar als kleine Zelle mit relativ großem Zellkern. Der Kern hat eine runde bis ovale Gestalt mit unterschiedlicher Chromatinstruktur. Sie ist dichter als die der Myeloblasten und Monoblasten, fleckig- wolkig oder locker-streifig bis netzig. In dem meist zart-grauen Zytoplasma finden sich relativ viel feine runde bis ovale Granula, die Mitochondrien, die das Zytozentrum auslassen, sich aber darum herum gruppieren. Im Phasenkontrastbild sind auch in vereinzelten Zellen Glanzkörner zu beobachten, die nach BESSIS mit den Gallschen Zellkörperchen identisch sind. In unserem Beobachtungsgut waren sie kaum vertreten.

Größenmessungen

Insgesamt werden 53 Lymphozyten ausgemessen. Die Meßwerte liegen dabei relativ dicht beieinander, was für die Einheitlichkeit des Kollektivs spricht. (s.Tab.5 + 6).

Der Lymphozyt ist mit einem Mittelwert von 65,74 $\mu m^2 \pm 13,78 \mu m^2$ für die Zellfläche erwartungsgemäß die kleinste der drei gemessenen Zelltypen. (Eine Unterscheidung in bewegliche und sessile Zellen wird bei den Lymphozyten nicht getroffen, da fast alle Lymphozyten zur Bewegung fähig sind, dies jedochwegen der unterschiedlichen Beobachtungsdauer nicht immer festgehalten werden kann). Der Zellkern hat fast die gleiche Größe wie der Myeloblastenkern mit $42,32 \mu m^2 \pm 6,73 \mu m^2$. Aus diesen Werten ergeben sich die anderen Größen, ausgehend wieder

Tabelle 5

Lymphozyten Bewegungstyp III

N		Zell-fläche/μm^2	Kern-fläche/μm^2	Zelldurch-messer/μm	Kerndurch-messer/μm
1	167/2o87 2o9o	83,o	51,2	1o,28	8,o7
2	167/2255	72,5	5o,8	9,61	8,o9
3	1o1/956	81,5	49,6	1o,18	7,94
4	1o1/956	77,8	42,5	9,95	7,35
5	1o1/956	7o,7	49,9	9,49	7,97
6	1o1/956	73,2	41,2	9,65	7,24
7	1o1/956	57,o	41,5	8,52	7,27
8	1o1/956	7o,7	55,8	9,49	8,43
9	1o1/978	89,o	57,4	1o,64	8,55
1o	259/2414	46,9	33,5	7,72	6,53
11	259/2414	53,8	37,8	8,27	6,93
12	259/2414	49,9	35,3	7,93	6,7o
13	259/2414	7o,2	49,1	9,45	7,9o
14	51/1286	111, 4	6o,2	11,91	8,74
15	79/954	8o,3	44,o	1o,11	7,48
16,	1o1/94o	5o,4	3o,o	8,o1	6,18
17	22/63o	81,8	46,9	1o,2o	7,72
18	51/716	52,o	4o,o	8,13	7,13
19	29/718	87,6	41,7	1o,56	7,28
2o	51/658	62,4	36,9	8,91	6,85
21	51/79o	95,5	47,7	11,o2	7,79
22	51/79o	46,9	33,5	7,72	6,53
23	51/79o	64,1	47,7	9,o3	7,79
24	51/771	43,9	27,1	7,47	5,87
25	51/739	72,7	56,3	9,62	8,46
26	51/739	44,7	3o,1	7,54	6,19
27	51/739	68,4	48,6	9,33	7,86

Tabelle 5

Lymphozyten Bewegungstyp III

N	Kern-Plasma-Relation	Kern-Plasma-Durchmesser-Relation	Geschwindigkeit µm/min	Kernklasse
1	o,62	o,79	1,24 1,29	1/2
2	o,7o	o,84	6,14	1/2
3	o,61	o,78	6,79	1/2
4	o,55	o,74	12,1	1/2
5	o,71	o,84	1o,3	1/2
6	o,56	o,75	8,75	1/4
7	o,73	o,85	8,22	1/4
8	o,79	o,89	5,13	1/2
9	o,64	o,8o	1o,7 11,9	1/2
1o	o,71	o,85	8,87	1/4
11	o,7o	o,84	4,16 + 12,36 7,96 + 4,83	1/4
12	o,71	o,84	5,65	1/4
13	o,7o	o,84	7,54	1/4
14	o,54	o,73	1,23 1,23	1/2
15	o,55	o,74	1,34 2,oo 1,41	1/2
16	o,6o	o,77	o,53	1/4
17	o,57	o,76	1o,2	1/2
18	o,77	o,88	22,5 14,2	1/4
19	o,48	o,69	19,1	1/4
2o	o,59	o,77	7,1	1/4
21	o,5o	o,71	6,9o	1/2
22	o,71	o,85	7,99 4,oo 2,58	1/4
23	o,74	o,86	28,3	1/2
24	o,62	o,79	1,39	1/8
25	o,77	o,88	14,4	1/2
26	o,67	o,83	8,63	1/4
27	o,71	o,84	3,28	1/2

Tabelle 6

Lymphozyten Bewegungstyp I + II

N		Zell-fläche μm^2	Kern-fläche μm^2	Zelldurch-messer μm	Kerndurch-messer μm
28	1o1/948	79,35	49,33	1o,o5	7,93
29	79/954	48,7	37,5	7,87	6,91
3o	79/853	62,6	46,2	8,93	7,67
31	79/853	7o,7	48,1	9,49	7,83
32	79/963	79,o	5o,4	1o,o3	8,o1
33	1o1/977	52,8	33,5	8,2o	6,53
34	1o1/977	55,2	27,9	8,38	5,96
35	167/2o87 2o9o	81,3	5o,7	1o,17	8,o3
36	167/2256	51,6	32,7	8,1o	6,45
37	1o1/978	77,5	44,6	9,93	7,53
38	1o1/978	66,6	35,6	9,21	6,73
39	1o1/956	63,5	37,2	8,99	6,88
4o	1o1/956	66,9	44,3	9,23	7,51
41	1o1/946	44,2	27,9	7,5o	5,96
42	1o1/946	43,5	31,7	7,44	6,35
43	1o1/946	41,4	31,1	7,26	6,29
44	1o1/946	33,5	22,4	6,53	5,34
45	22/546	95,9	64,5	11,o5	7,72
46	29/718	88,3	41,4	1o,6o	7,26
47	51/658	42,1	31,4	7,32	6,32
48	51/658	62,8	42,8	8,94	7,38
49	51/79o	53,8	35,3	8,27	6,7o
5o	51/771	46,9	34,8	7,72	6,65
51	51/739	1oo,6	76,9	11,32	9,89
52	51/739	55,9	43,o	8,43	7,4o
53		59,1	38,2	8,67	6,97

Tabelle 6

Lymphozyten Bewegungstyp I + II

N	Kern-Plasma-Relation	Kern-Plasma-Durchm.-Relat.	Kernklasse
28	o,62	o,79	1/2
29	o,77	o,88	1/4
3o	o,74	o,86	1/2
31	o,68	o,83	1/2
32	o,64	o,8o	1/2
33	o,63	o,79	1/4
34	o,51	o,71	1/8
35	o,62	o,79	1/2
36	o,36	o,8o	1/4
37	o,58	o,76	1/2
38	o,53	o,73	1/4
39	o,59	o,77	1/4
4o	o,66	o,81	1/2
41	o,63	o,79	1/8
42	o,73	o,85	1/4
43	o,75	o,87	1/4
44	o,67	o,82	1/8
45	o,67	o,7o	1/2
46	o,47	o,68	1/4
47	o,75	o,86	1/4
48	o,68	o,83	1/2
49	o,66	o,81	1/4
5o	o,74	o,86	1/4
51	o,76	o,87	1
52	o,77	o,88	1/2
53	o,65	o,8o	1/4

von einer annähernd runden Zell- bzw. Kernform: Der Zelldurchmesser beträgt 9,15 µm, der Kerndurchmesser 7,3o µm.

Deutlich sind die Unterschiede jedoch in den Verhältniszahlen der Flächen bzw. der Durchmesser.

Die Kern-Plasma-Relation der Fläche liegt bei o,65 ± o,16, also deutlich höher als bei den beiden Stammzellen, das Verhältnis bei den Durchmessern liegt mit o,81 ± o,o5 ebenfalls eindeutig höher.

Die Einteilung der Kernklassen zeigt folgendes Verteilungsmuster: Das Gros der Zellen findet sich in den beiden Kernklassen K 1/4 und K 1/2, wobei in beiden Klassen gleichviel Zellen vorhanden sind mit 45,2% = 24 Zellen. In K 1/8 finden sich noch 7,5 % und in K 1 findet sich noch 1 Zelle = 1,9%. (s. auch Übersichtstabelle II und III).

Bewegungsformen

Die Bewegungsformen der Lymphozyten sind im Verhältnis zu den anderen beiden untersuchten Zellen relativ stereotyp. Es fällt jedoch auf, daß sich praktisch alle Zellen teilweise im Bewegungsstadium II befinden, eine Zelle vom Typ I wird fast gar nicht bei den vitalen Zellen beobachtet. Allerdings ist der Anteil von Bewegung zu ortsständiger Aktivität sehr zu Gunsten der letzteren verschoben.

Der Fortbewegung ist oft ein längeres Stadium ortsständiger Aktivität vom Typ II vorgelagert. Dabei zeigen die Zellen jedoch lediglich gehäuft Zytoplasmaausläufer, die an wechselnden Stellen der Zelloberfläche ausgebildet werden und schnell wieder eingezogen werden. Sie sind relativ uniform

und schwach phasenpositiv. Kern- bzw. Zellrotationen am Ort werden nicht gesehen.

Beim Bewegungstyp III findet sich als markanteste Form der hinlänglich bekannte "Handspiegel", bei dem hinter dem Hauptteil der Zelle, der auch den Kern enthält, eine Zellausstülpung, der Uropode, hinterhergezogen wird, der dem Handgriff eines Handspiegelsähnelt (Abb.18).+ Diese Form wird am häufigsten bei den etwas schnelleren Bewegungen angetroffen. Bei niedrigeren Geschwindigkeiten bleibt die Zelle meist länggestreckt. Am vorderen Zellteil findet sich häufig eine undulierende Membran. Teilweise erscheint ein rückwärtiger Zellausläufer abgeschnürt, wird jedoch später wieder nachgezogen. Der Zellkern wird während der Bewegungen teilweise stark verformt, meist in Form einer Elongation mit ringförmiger Einschnürung, ist jedoch nie im hinteren Zellbürzel zu finden. Dort ist jedoch häufig die Hauptmasse der Granula zu beobachten. Als weiteres lymphozytenspezifisches Phänomen wird mehrfach Peripolesis und Emperipolesis, die Kontaktaufnahme mit anderen Zellen, beobachtet, welches in keiner anderen Beobachtung zu sehen ist.

Insgesamt ist der Bewegungsablauf in den meisten Fällen zielgerichtet.

Geschwindigkeiten

Bei den Geschwindigkeiten ergibt sich eine mittlere Fortbewegungsgeschwindigkeit von 7,22 µm/min. Dabei treten außerordentlich verschiedene Schnelligkeiten auf. Die schnellste Zelle läuft mit einer Geschwindigkeit von 28,3 µm/min., die langsamste hat nur eine Geschwindigkeit von o,53 µm/min. Dabei ist diese Zelle nur im Anfangsstadium der Bewegung zu beobachten.

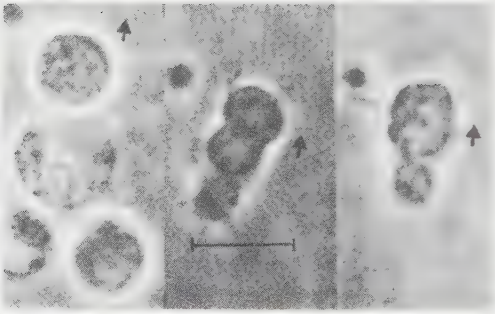


Abb.Nr.18: Typischer Lymphozyt zunächst in Ruhe, dann in Fortbewegung (Typ III). Neben einem Zellschatten 2 Lymphozyten (1.Teilbild), von denen sich der eine aus dem Ruhestadium elongiert (2. Teilbild) und einen deutlichen Kontraktionsring zeigt. Der Kern ist tigerfellartig stark strukturiert. Die Bewegungsform ist fast röhrenförmig, die Handspiegelform ist angedeutet (3.Teilbild). Die Granula sind im hinteren Zellteil angesammelt, der bürzelförmig gestaltet ist, und als Uropode bezeichnet wird. (Archivbild, Film Nr.2666).

\+ Auf weitere Abbildungen vom Lymphozyten wird verzichtet, da sie keine neuen Ergebnisse bringen.

Überhaupt hat es den Anschein, als seien die niedrigen Geschwindigkeiten darauf zurückzuführen, daß Anfangs- bzw. Endphasen von Bewegungen gemessen werden.

Statistische Ergebnisse

Um die Möglichkeit zu prüfen, ob aus den gemessenen Größen der Zellen schon eine Vorentscheidung über die Spezifität der Zelle zu treffen ist, werden die gemessenen Zellflächenergebnisse in den T-Test eingegeben. Dabei kommt es im einzelnen zu folgenden Ergebnissen:

Ausgehend von einer unteren Wahrscheinlichkeitsgrenze für die Verwechselungsmöglichkeit von 5% werden die erforderlichen Werte im Vergleich der Monoblasten mit den Myeloblasten sowie der Monoblasten mit den Lymphozyten erreicht. Im ersten Fall liegt der Wert $P_{FG\ 62}$ bei 17,88; erforderlich für die Wahrscheinlichkeitsgrenze von o,1% wäre nur 3,5 gewesen. Eine Verwechselung von der Größe her ist also fast unmöglich. Ähnlich liegt der Fall beim zweiten Vergleich. $P_{FG\ 5o}$ liegt bei 8,33, dabei hätten für eine untere Wahrscheinlichkeitsgrenze für o,1% schon 3,5 ausgereicht. Im Gegensatz dazu wird beim Vergleich von Myeloblasten und Lymphozyten der erforderliche Wert für die 5% untere Wahrscheinlichkeit mit einem $P_{FG\ 88}$ von 1,98 knapp unterschritten; es ergab sich ein Wert von 1,95.

Daraus ergab sich eindeutig, daß eine Unterscheidung der beiden im Phasenkontrastbild am leichtesten zu verwechselnden Zellen bei der Menge des vorliegenden Beobachtungsgutes allein aus der Größe nicht zu treffen ist.

+ Berechnungen durchgeführt im Institut für Statistik der Freien Universität Berlin, Leitung Prof.Belitz.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Es werden Knochenmarkzellen bei nicht leukämischen Erkrankungen mit dem Kern-Plasma-Verhältnis o,7 einer genauen Größenmessung und Verlaufsbeobachtung unterzogen. Dabei werden drei Zellgruppen unterschieden: Myeloblasten, Monoblasten und Lymphozyten (Übersichtstabellen I - III).

Die statistisch und aus den Größenmessungen am besten zu definierende Zelle- der Monoblast - ist die größte der drei Zellen mit einer mittleren Zellfläche von 152,2 μm^2 und einer mittleren Kernfläche von 84,o μm^2. Die Durchschnittswerte für die Durchmesser betragen 13,8 μm für die Zelle und 1o,3 μm für den Kern. Das Kern-Plasma-Verhältnis beträgt bei den Flächen o,57 und bei den Durchmessern o,74. Die Durchschnittsgeschwindigkeit beträgt bei den beweglichen Zellen, die einen Anteil von 33% stellen, 1,98 μm/min. Der ganz überwiegende Anteil der Zellen findet sich in der Kernklasse K 1 mit 63,1%. Die ziemlich bewegliche Zelle unterliegt einem recht häufigen Gestaltwechsel, wobei die Geschwindigkeit eine Rolle zu spielen scheint. Es können sowohl spitze als auch abgeplattete führende Zellteile beobachtet werden, die transparenten Membranen sind ziemlich flüchtig und undulierend über den ganzen Zelleib verteilt. Schaukelnd ungerichtete Bewegungen sowie Zickzack-Läufe sind häufiger zu sehen. Die teilweise starken Zellverformungen schliessen Kernverformungen mit ein. Bei den ortsständigen Zellen vom Bewegungstyp II werden heftige Kernrotationen und Zellkontraktionen beobachtet sowie eine heftige Oberflächenaktivität in Form von Blistern und

Pinozytosevorgängen.

Die zweifellos häufigste Zelle- der Lymphozyt - ist auch die kleinste Zelle mit einer durchschnittlichen Zellfläche von 65,7 μm^2 bzw. einer Kernfläche von 42,3 μm^2. Der mittlere Durchmesser für Zelle und Kern beträgt 9,15 μm bzw. 7,3 μm. Auffallend ist hierbei eine geringe Streubreite der Messwerte, die für ein recht einheitliches Kollektiv sprechen. Das mittlere Verhältnis von Kern zu Plasma beträgt o,65, das der Durchmesser o,81. Die Durchschnittsgeschwindigkeit beträgt 7,22 μm/min, wobei interessant ist, daß fast alle Lymphozyten während der Beobachtungszeit den Bewegungstyp wechseln. Die von RIND angegebenen Prozentzahlen für die Bewegungstypen-Anteile können nicht bestätigt werden. Der Hauptteil der Lymphozyten verteilt sich gleichmäßig auf die Kernklassen K 1/4 und K 1/2 mit jeweils 45,2%. Beim Bewegungstyp III herrscht überwiegend als markanteste Form die "Handspiegelform" vor. Peripolese und Emperipolese kann ebenfalls beobachtet werden, und auch sonst erscheint die Bewegung der Lymphozyten zielgerichtet. Bei den beiden anderen Zellgruppen kann keinerlei ähnliche Bewegung festgestellt werden. Der Bewegungstyp II unterscheidet sich weniger von dem der anderen Zellgruppen. Auch bei den Lymphozyten ist eine gewisse Oberflächenaktivität zu sehen, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei den beiden anderen Zellarten.

Die dritte Zellgruppe - die Myeloblasten - unterscheiden sich im Ruhestand im Phasenkontrastbild von den Lymphozyten nur wenig, die Größenunterschiede reichen für eine Abtrennung der beiden Zellarten nicht aus. Die mittleren Flächen für

Zelle und Kern betragen 81,0 μm^2 bzw. 43,99 μm^2, sind damit zwar geringfügig größer als die Lymphozyten, die Streubreite liegt hierbei allerdings deutlich höher als bei den Lymphozyten. Die Durchmesser liegen entsprechend mit 10,05 μm für die Zelle und mit 7,41 μm für den Kern leicht über denen der Lymphozyten. Die Kern-Plasma-Relation dieser Stammzelle liegt jedoch deutlich unter der der ausgereiften Lymphozyten mit 0,54, bei den Durchmesserrelationen liegt der Myeloblast auch nur bei 0,73. Die Durchschnittsgeschwindigkeit liegt mit 1,91 μm/min im Größenbereich der anderen Stammzelle. Der Hauptteil der Zellen findet sich im Kernklassenbereich von K 1/2 mit 53,8%, K 1/4 ist noch mit 28,2% vertreten.

Die Fortbewegung der Myeloblasten geht in der Mehrzahl der Fälle ohne größere Verformungen einher, bei den langsamen Bewegungen bleiben die Zellen völlig abgerundet und kugeln rotierend vorwärts. Die schnelleren Myeloblasten nehmen eine teils wurmartige, teils kegelförmige Gestalt an. Spezifisch für die Myeloblasten ist jedoch, daß - wie bei fortlaufender Beobachtung zu sehen - die Spitze der Zelle voranläuft im Gegensatz zu den Lymphozyten, bei denen der führende Teil stets abgerundet ist. Häufig kommen auch kreiselnde und schaukelnd-rollende Figuren ohne Fortbewegung vom Ort vor, die jedoch nicht exakt gemessen werden können, da sie zu keiner geradeaus gerichteten Lokomotion führen. Der Bewegungstyp II zeigt im Gegensatz zu den Lymphozyten häufig eine starke Oberflächenaktivität mit Blistern und Pseudopodien, die teilweise außerordentlich kurzfristig entstehen und vergehen können. Insgesamt erscheint die Bewegung des einzelnen

Myeloblasten wenig zielgerichtet und hat einen mehr zufälligen Charakter.

Die Größenunterschiede allein reichen nicht aus, um eine Differenzierung der Zellgruppen im Phasenkontrastbild durchzuführen, wie aus dem Ergebnis des T- Testes hervorgeht. Es können statistisch nach Größenmessungen lediglich zwei Kompartimente getrennt werden, von denen das eine die größeren Zellen- die Monoblasten- enthält, und das andere die sich in Morphologie und Größe sehr ähnlichen Gruppen der Myeloblasten und der Lymphozyten. Wie auch aus den Graphiken I und II hervorgeht, überlagern sich die beiden letzten Zellgruppen in erheblichem Maße, was die Größe von Zelle und Kern und die Zellklasseneinteilung anbetrifft. Deshalb wird zur Differenzierungshilfe das Bewegungsverhalten dieser Zellgruppen genau untersucht, wobei sich deutlich Unterschiede bezüglich der Bewegungsformen und der Geschwindigkeiten ergeben, die zur Unterstützung der Morphologie herangezogen werden können, wenn eine Verlaufsbeobachtung möglich ist.

Übersichtstabelle I

Mittelwerttabelle

	Myeloblasten	Monoblasten	Lymphozyten
Zellfläche μm^2	81,o	152,2	65,7
Kernfläche μm^2	43,99	84,o	42,3
Zelldurchmesser μm	1o,o5	13,8	9,15
Kerndurchmesser μm	7,41	1o,3	7,3
Kern-Plasma-Relation	o,54	o,57	o,65
Kern-Plasmadurchmesser-Relation	o,73	o,74	o,81
Zellfläche σ μm^2	27,4	38,2	13,78
Kernfläche σ μm^2	22,2	28,6	6,73
Kern-Plasma-Relation σ	o,o3	o,o6	o,16
Kern-Plasmadurchmesser-Relation σ	o,o7	o,o8	o,o5
Fortbewegungsgeschwindigkeit μm/min	1,91	1,98	7,22

Übersichtstabelle II

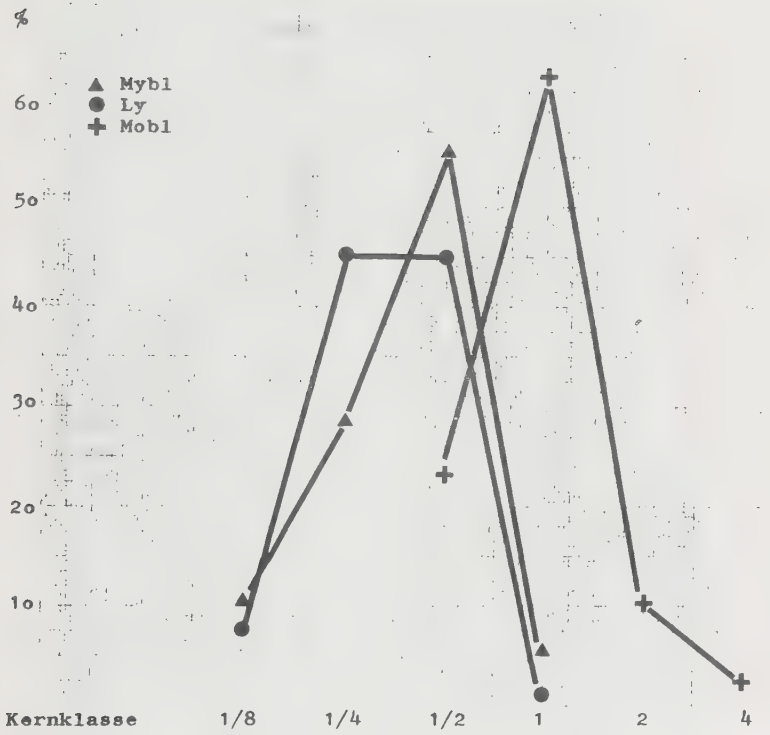
Anzahl der einzelnen Zellarten in den verschiedenen Kernklassen nach LEIBETSEDER

	1/8	1/4	1/2	1	2	4	Summe
Myeloblasten	4	11	21	2			38
Monoblasten			9	24	4	1	38
Lymphozyten	4	24	24	1			53

Übersichtstabelle III

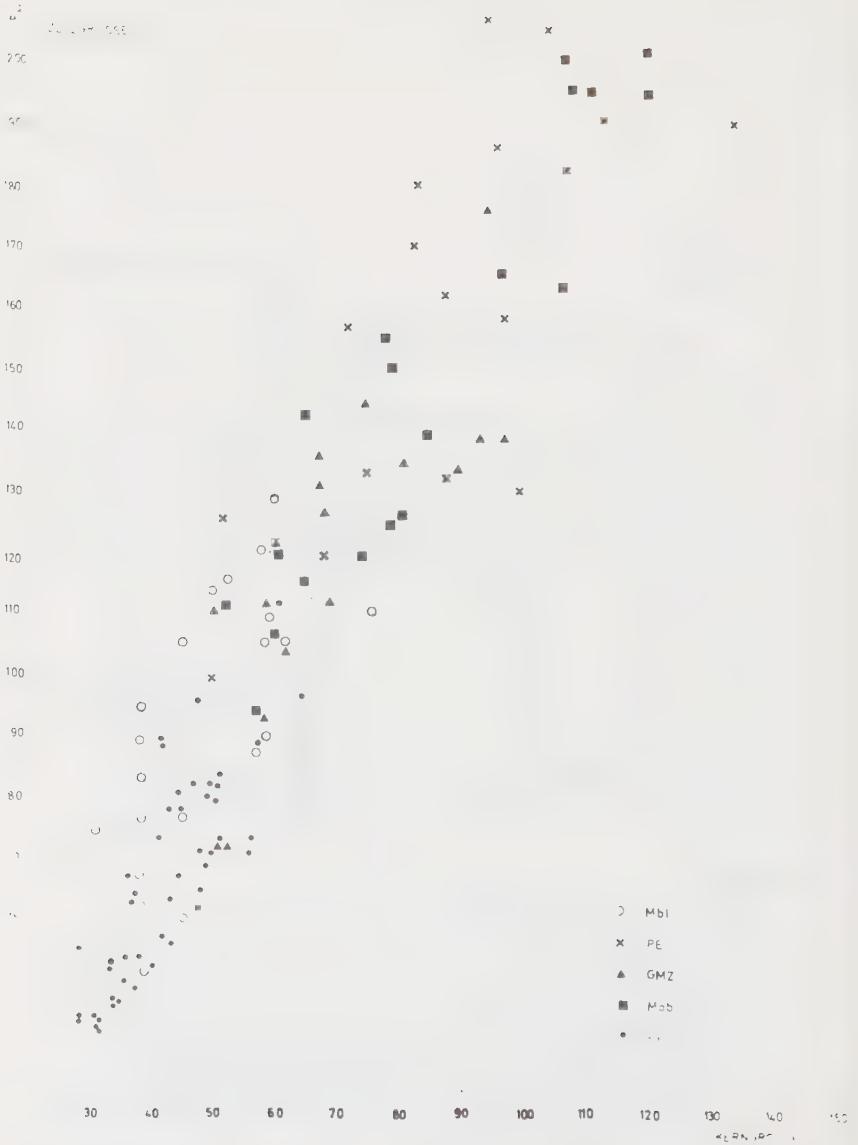
Prozentualer Anteil der einzelnen Zellarten an den Kernklassen nach LEIBETSEDER

	1/16	1/8	1/4	1/2	1	2	4
Myeloblasten		1o,52	28,95	55,27	5,26		
Monoblasten				23,69	63,13	1o,54	2,64
Lymphozyten		7,55	45,28	45,28	1,89		



Graphik I

Übersicht über die Kernklassenverteilung nach LEIBETSEDER. Deutlich die Überlagerung der Gruppen der Lymphozyten und der Myeloblasten, während die Gruppe der Monoblasten ihren Schwerpunkt klar bei den größeren Zellen hat.



Graphik II

Streupunktkurve der Kern- und Zellgrößen in μm^2. Auch hier zeigt sich sehr deutlich, daß sich die beiden Kompartimente Lymphozyten - Myeloblasten überlagern, wenn auch die Myeloblasten etwas weiter nach oben verlagert erscheinen. Die Monoblasten liegen wieder klar über den beiden anderen Zellarten. Mit eingezeichnet sind hier die Größen von Proerythroblasten und Gewebsmastzellen.

Mbl.: Myeloblasten Mobl.: Monoblasten
PE.: Proerythroblasten Ly.: Lymphozyten
GMZ.: Gewebsmastzellen

Diskussion

Bei unserer Fragestellung, ob sich die jüngste leukopoetische Stammzelle im menschlichen Knochenmark phasenoptisch von den Lymphozyten eindeutig unterscheiden läßt, sind wir davon ausgegangen, daß die Stammzelle morphologisch bislang noch nicht eindeutig definiert worden ist. Die Schwierigkeit der morphologischen Differenzierung liegt in der großen Ähnlichkeit von Größe und Kern-Plasma-Verhältnis der Myeloblasten und der Lymphozyten. Erst MOFFAT, DICKE und ROSSE beginnen, besser zu definieren.

So umfaßt die Beschreibung von MOFFAT ein Zellspektrum von kleinen Lymphozyten bis zum großen basophilen Blasten, denen allen eine hohe Kern-Plasma-Relation gemeinsam ist. Den Kern gibt er als leptochromatisch an, das Plasma der Zellen hat unterschiedliche Basophilie. ROSSE engt den Kreis der in Frage kommenden Zellen schon erheblich ein. 1967 beschreibt er mit YOFFEY die "transitional cells", die nach dem nach Pappenheim gefärbten Ausstrich mit der von BOLL, STOBBE et.al. als Myeloblast bezeichneten Zelle itentisch zu sein scheint. Er trennt sie von den kleinen Lymphozyten ab, indem er Unterschiede in Größe und Chromatinzeichnung zu Hilfe nimmt. Auch im Phasenkontrast ist der Myeloblast größer als der Lymphozyt, jedoch nur geringfügig. Gleichzeitig ist die Chromatinzeichnung des Kerns bei den Lymphozyten gröber und dunkler als bei den Myeloblasten (s.a. BESSIS 1973). Im Zytoplasma enthält der der Myeloblast ein ausgeprägtes Zytozentrum, mehr

Granula, das Zytoplasma ist dunkler als bei den Lymphozyten.

DICKE und Mitarbeitern gelang kürzlich elektronenmikroskopisch die klare Differenzierung der Myeloblasten, indem sie unterschiedliche Zellbestandteile nachweisen, die jedoch im Phasenkontrastbild nicht erkennbar sind.

Die meisten anderen Autoren definieren die Stammzelle funktionell, wobei sie die Lymphozyten oder auch die größeren Lymphoidzellen als mögliche Stammzelle in Betracht ziehen. So schließt LOUTIT aus seinen Versuchen über die Neubesiedlung des Knochenmarks, Zellerneuerung in der Milz und die DNS- Synthese auf den kleinen Lymphozyten als Stammzelle. URASINSKI/ HABICHT weisen nach, daß in diesem Zusammenhang die Gruppe der Lymphozyten ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf ihren Nucleinsäuregehalt zeigen, was auch von TREPEL/ RASTETTER und COOPER/ RUBIN mit Hilfe autoradiographischer Untersuchungen nachgewiesen wird. FLIEDNER et. al. meinen, bei letal behandelten Hunden Hinweise dafür gefunden zu haben, daß sich alle Blutzellen aus den kleinen Lymphoidzellen entwickeln.

HARRIS et. al. finden ebenfalls Zellen im Knochenmark bestrahlter Tiere in der nachfolgenden Erholungsphase, die DNS produzieren und sich teilen, und die in ihrer Morphologie den Lymphoidzellen ähneln. Sie stellen sie den Hämatogonien oder Mikromyeloblasten anderer Autoren gleich. Auch LAJTHA weist darauf hin, daß BECKER und BARNES mit Hilfe von radioaktiv markierten Isotopen nachgewiesen haben, daß alle Knochenmarkszellen von einer Population stammen. LAJTHA meint aber auch, daß die morpholo-

gische Charakterisierung dieser Zellen zur Definition nicht ausreicht. Die meisten Autoren sprechen eben nur von kleinen, mittleren und großen Lymphozyten bzw. Lymphoidzellen, ohne eine exakte Trennungslinie erkennen zu lassen.

Unsere Fragestellung lautet also, ob sich im menschlichen Knochenmark diese Stammzelle phasenoptisch eindeutig von den Lymphozyten unterscheiden läßt.

Unsere Verlaufsbeobachtungen von Zellen aus nichtleukämischem Knochenmark beziehen sich auf Zellen mit dem Kern-Plasma-Verhältnis von o,7. Dabei läßt sich die Gruppe der Monoblasten im Phasenkontrastbild schon durch ihre Größe eindeutig von den beiden anderen Zelltypen unterscheiden. Außerdem ist die Kernlappung bzw. - einbuchtung oft ein gutes Unterscheidungsmerkmal. Bei den Myeloblasten und Lymphozyten erlaubt jedoch die Größe von Zelle und Kern keine ausreichende Differenzierung. Die Kernstruktur ist bei diesen Zelltypen zwar unterschiedlich, reicht aber allein als Unterscheidungsmerkmal nicht aus, ebenso wenig wie die Kern-Plasma-Relation, obgleich sie sich metrisch noch am meisten unterscheiden. (s.a. Übersichtstabellen I und II sowie Graphiken 1 + 2). Das wesentlichste Unterscheidungsmerkmal des Myeloblasten vom Lymphozyten ist seine Kinetik. In der Laufbildanalyse erweisen sich die Bewegungstypen sowie die Fortbewegungsgeschwindigkeit eindeutig unterschiedlich.

Schon RICH et.al. beschreibt 1939 ein unterschiedliches Bewegungsverhalten von Myeloblasten und Lymphoblasten, wobei jedoch leukämische und normale Blasten nicht getrennt werden. So sind z.B. die von ihm be-

obachteten wurmartigen Bewegungen mit den von NITZEL beschriebenen bei leukämischen Myeloblasten identisch. An normalen Myeloblasten können wir die Kontraktionsringe bestätigen (Abb.4,5), es kommt jedoch nicht zu wurmartigen Bewegungen wie bei RICH, eventuell wegen anderer Mediumbeschaffenheit. Aber die von RICH beschriebenen Polaritäten kommen in unseren Kulturen nicht vor. Die Zellen behalten bei uns nur für ralativ kurze Zeit ihre Richtung bei, um dann einen abrupten Richtungswechsel durchzuführen, ohne daß es dabei zu einer Schwenkung der gesamten Zelle kommt. Heftige Zell- und Kernrotationen werden jedoch auch von uns wie von RICH bei normalen Blasten gesehen.

DeBRUYN lehnt dann 1944 eine Unterscheidung mit Hilfe von Bewegungsformen ab, weil sich Lymphozyten und Myeloblasten in ihren lichtoptischen Präparaten (noch ohne Phasenkontrast) zu stark ähneln. Auch in der neuesten Arbeit von KASS/ DeBRUYN (1967) wird diese Ansicht wiederholt. Die Verfasser lassen jedoch wesentliche Unterscheidungsmerkmale außer acht, indem sie übersehen, daß sich Myeloblasten nicht in der Handspiegelform fortbewegen, und daß häufiger ein spitzes Pseudopodium an der Zellspitze führt. Auch ist unseres Erachtens die von RICH angeführte und von NITZEL 1975 bestätigte wurmartige Bewegung den normalen Myeloblasten nicht zuzuordnen. Die schon von anderen Autoren als für den Lymphozyten charakteristisch beschriebene Peripolesis und Emperipolesis (HUMBLE, PULVERTAFT, BERMAN, SHARP) wird ebenfalls in dieser Arbeit von KASS/DeBRUYN

nicht erwähnt. Sie sind unserer Meinung nach ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal, da dieses Verhalten bei den Myeloblasten noch nie beobachtet wurde.

YOFFEY und ROSSE haben bei ihrer Suche nach der undeterminierten Stammzelle die "transitional cell" aus der inhomogenen Lymphozytengruppe herausgehoben. Sie deckt sich in ihrer Phasenkontrastmorphologie mit dem Myeloblasten unserer Beobachtungen. Bezüglich der Bewegungsformen ihrer "t.c." kommen sie jedoch zu dem Schluß, daß wegen ihrer wenigen Beobachtungen eine Bewegungscharakteristik als Unterscheidungsmöglichkeit nicht gegeben sei. Sie schreiben sogar den "t.c." eine lymphozytenähnliche Bewegung zu, die in unseren Präparaten jedoch nicht gesehen wurde. Die "Handspiegelform" sowie undulierende Membranen an der Vorderseite der Zelle können wir nur für die Lymphozyten bestätigen, Myeloblasten laufen mit der Spitze der Zelle voran. ROSSE schließt weiter aus seinen Beobachtungen über die Bewegungsformen und aus Verkleinerungen der "t.c." auf einen Übergang zum Lymphozyten. Das können wir nicht bestätigen.

BOLL (1973) gelingt es andererseits, die Umwandlung des Myeloblasten zum Promyelozyten im Film zu zeigen, was diese Zelle eindeutig zum Vorläufer der Granulopoese stempelt. (BOLL (1974) gelingt es weiter, die Umwandlung vom Monoblasten zum Promonozyten darzustellen. Weiter werden einige Übergänge vom Myeloblasten zu Monoblasten gesehen, also Zellvergrößerungen im Gegensatz zu ROSSE, sodaß wir nur diese beiden Formen des Myeloblasten und des Monoblasten als determinierte Stammzelle der

Granulo- und Monopoese ansehen können, nicht jedoch den Lymphozyten, denn bei diesen Zellen erfolgt kein Zellwachstum.

Zusätzlich zu den von uns festgestellten Differenzen im Bewegungsverhalten und der Fortbewegung ist nun noch eine unterschiedliche Geschwindigkeit festzustellen. Während die Lymphozyten ganz allgemein als eine relativ schnelle Zelle angesehen werden, wird bisher dem Monoblasten noch keine generell meßbare Geschwindigkeit zugemessen. Nur bei den leukämischen Myeloblasten gibt NITZEL 4,6 µm/min. an. In der Literatur differieren auch die Angaben über die Geschwindigkeit der Lymphozyten. BESSIS bezieht sich auf DeBRUYN und gibt 33 µm/min an, während NORBERG et al. eine Geschwindigkeit von 18 - 24 µm/min finden, was eher mit den von uns gemessenen Spitzengeschwindigkeiten korreliert, auch unsere schnellsten gemessenen Lymphozyten erreichen eine Geschwindigkeit von über 2o µm/min. Die Durchschnittsgeschwindigkeit liegt jedoch bei uns erheblich niedriger, was mit den Messungen von KEMPS übereinstimmt, der ebenfalls Werte zwischen 1 und 1o µm/min. findet. In die Durchschnittsgeschwindigkeit geht die Zeit des langsameren Bewegungsbeginns mit ein (wobei wir auch Zellen gemessen haben, die relativ kurze Zeit im Beobachtungsfeld waren). Ob die Kulturbedingungen im halbfesten Medium eine Rolle gespielt haben, muß offen gelassen werden.

Die Schnelligkeit der Myeloblasten liegt eindeutig niedriger als die der Lymphozyten, die Monoblasten bewegen sich im gleichen Tempo wie die Myeloblasten. Für Geschwindigkeitsmessungen legen wir unseres Wissens erstmalig Material vor.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß es in unserem Beobachtungsgut nicht möglich ist, allein

aus der Morphologie und Größe die in Betracht gezogenen Zellen - Lymphozyten,-Myeloblasten und Monoblasten - exakt zu differenzieren. Die Phasenkontrastmikroskopie ist in dieser Hinsicht der Elektronenmikroskopie (BESSIS, DICKE) unterlegen. Zieht man jedoch die kinematographische Verlaufsbeobachtung - Bewegungsverhalten, Bewegungsform, Geschwindigkeit - hinzu, ist im Phasenkontrast die Differenzierung in Lymphozyten, Myeloblasten und Monoblasten durchaus möglich.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden insgesamt 130 Zellen aus dem menschlichen Knochenmark mit dem Kern-Plasma- Durchmesserverhältnis von o,7 im Phasenkontrastmikroskop beobachtet und bezüglich ihrer Größe, Morphologie, Kern-Plasma-Relationen und Kinetik untersucht. Dabei wurde mit Hilfe der Verlaufsbeobachtung festgestellt, daß sich in diesem Beobachtungsgut drei Gruppen von Zellen differenzieren lassen, nämlich Lymphozyten, Myeloblasten, Monoblasten. Allein aus Momentaufnahmen läßt sich lediglich der Monoblast von der Gruppe der beiden anderen Zellen trennen, während Myeloblasten und Lymphozyten sich in ihrer Morphologie und Größe so ähneln, daß eine Unterscheidung mit diesen Größen allein nicht möglich erscheint. Es werden jedoch artspezifische Bewegungsformen und Bewegungsverhalten gezeigt sowie eine unterschiedliche Geschwindigkeit gemessen, sodaß es möglich ist, unter zu Hilfenahme der Laufbildanalyse eine Trennung dieser beiden Zellgruppen durchzuführen.

Literaturverzeichnis

Ambrose, E.J.
Forester, J.A.
Mammalian cell movoments and the role of the cell surface charge
Europ.Tissue Cult.Sec.London
April 1968

Albrecht, M.
Studium über die Leukozytenbewegung und deren Beeinflußbarkeit in vitro
DMW 79 (1954), 1431

Baudisch,W.
Beckmann, A.
Janssen, H.L.
Klebrigkeit und Migrationsverhalten der Leukozyten unter Einwirkung von Stoffwechselhemmstoffen
Act.biol.med.germ.23 (1966), 265

Berman, C.
Interaction of macrophages and lymphocytes
Blood 26 (1925) 866

Bessis, M.
Living blood cells and their ultrastructure
Springer Verlag 1973

Boll, I.
Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen
Springer Verlag 1966

Boll, I.
Morphologische phasenkontrast- kinematographische Studien zum Verhalten von Knochenmarkszellen in vitro VII. Reifung von Myeloblasten zu Promyelozyten und Myelozyten bei myeloischen Leukämien
Blut XXVII (1973) 159

Boll, I.
Morphologische phasenkontrast- kinematographische Studien zum Verhalten von Knochenmark- und Blutzellen in vitro VIII. Das Monozytensystem beim Menschen
Blut XXVIII (1974), 8

Boll, I.
Nitzel, H.
Die Kinetik leukämischer Blasten (Myeloblasten, Monoblasten, Lymphoblasten) im Vergleich mit Mononucleosezellen
Leukämie (1972), 2oo

DeBruyn, P.P.H.
Locomotion of blood cells in tissue cultures
Anat.record.89 (1944), 43

DeBruyn, P.P.H.
The motion of migrating cells in tissue cultures of lymph-nodes
Anat.record.93 (1945), 295

Cooper, H.L.
Rubin, A.D.
PNA- metabolish in lymphocytes stimulated by phytohämagglutinin
J. Blood XXVI (1965),1o14

Cronkite, E.P.
Fliedner, T.M.
Granulopytopoesis
New Engl. J.of med. 27o (1964), 1347

Dicke, K.A.
Identification of cells in primate bone marrow, resembling the hemopoetic stemm cells in the mouse
Blood 42 (1973), 195

Fleck, L.
Le phénoméne de leukergie et le possibilité de la utiliser dans lhematologie
Sang 2o (1949), 1

Fliedner, T.M.
Thomas, D.E.
Fache, I.
Thomas, D.
Cronkite, E.P.
Pattern of regeneration of nitrogen-mustard treated marrow after transfusion into lethally irradiated homologous recipients
Vortrag gehalten 1964 September

Franks, L.L.
Riddle, D.N.
Seal, P.
Aktion- life filaments and cell movement in human ascites tumor cells
Exp.Res. 54(1969), 157

Habernęy,M.
Wohlfahrt-Bottermann K.E.
Stockem, W.
Kinematographische Untersuchungen über das Bewegungsverhalten der Zelloberfläche von Amoeba proteus
Cyt.1 (197o), 7o

Hansen, H.G. Das Phasenkontrastverfahren in der Hämatologie Stormarn Verlag (1955)

Harris, P.F. Kugler, J.H. The use of regenerating bone marrow to protect guinea-pigs against lethal irradiation Act.hemat. 32 (1964) 164

Heilmeyer, Handbuch der Inneren Medizin Band 2. 44

Hiraki, K. Ofuji, T. Microkinematographic vital observations on the bloodcells and its clinical application Act.med.Jap. 19, (1956) 4o6

Humble, J.G. Jayne,W.H.W. Pulvertaft, P.J.V. Biological interaction between lymphocytes and other cells Brit.J.Haematol. 2 (1956) 283

Kass, L. DeBruyn, P. Chemotaxis of mature and immature blood cells in tissue cultures Anat.record. 159 (1967), 115

Keiser, G. Autoradiographic study on the origin and fate of small lymphoid cells in the dog bone marrow Blood, 24 (1964), 254

Kemps, D. Lymphozytengeschwindigkeit in vitro bei Betatron bestrahlten Patienten Diss. 1968, F.U. Berlin, Med. Fakultät

Keyserlingk, D. Über die Bedeutung des intracellulären kontraktilen Systems für die Lokomotion des Fibroblasten Cyt. 1 (197o), 259

Lajtha, L.G. Response of bone marrow stem cells cells to ionizing radiations Current topics in Rad.Res.1 (1965), 141

Lewis, P.H. — Locomotion of rat lymphocytes in tissue cultures Bull Johns Hopkins Hosp.53 (1933), 147

Loutit, J.F. — Grafts of Haemopoietic tissue; the nature of haemapoietic stem cells J. clin.path.2o (1967) 535

Marshall, A. Lichtman, M.D. Weed, P.L. — Alteration of the cellperiphery during granulocyte maturation: relationship to all functions Blood 39 (1972) 3o1

Marshall, A. Lichtman, M.D. — Cellular deformability during the maturation of the myeloblast New Engl.med.283 (197o), 943

Maximow, A. — Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere Fol. hämatol. 8 (19o9)

Metcalf, D. — Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro J.cell Physiol. 77 (1969), 277

Metcalf, W.K. — Differential response of lymphocytes in phytohaemagglutinincultures in "The lymphocyte in immunology and haemopoiesis" Ed.by J.M.Yoffey Verlag London (1967), S.62

Metcalf, D. Moore, M.A.S. Williams, N. — Identification of bon marrow transitionallymphocytes as progenitors of granulocytes and monocytes 1.meeting Europ.Div.Intern.Soc. Haemat., Milano (1971), 175

Moffat, D.J. — Identity of the haemopoietic stem cell The Lancet 9 (1967), 547

McDonald, G.A.
Dodds, T.C.
Cruickshank, B.
Atlas der Hämatologie
Thieme Verlag (1972), 161

Naegali, O.
Blutkrankheiten und Blutdiagnostik im Lehrbuch der Haematol.
Verlag v.Veit, Leipzig (19o8), 199

Norberg, B.
Rydgren, L.
Söderström, N.
Lymphocyte locomotion, morphological criteria of the direction of lymphocyte movement
Lymphology 6 (1973), 187

Philipsborn, E.
Untersuchungen über den Erregungszustand der Leukozyten gesunder und kranker Menschen
Dtsch.Arch.klin.Med.168 (193o), 239

Philipsborn, E.
Die lebenden weißen Blutzellen
Fortsch.Med.82 (1964), 449

Projan, A.
Bacigalupo
Über die Kontaktinhibition der Zellbewegung in vitro
Wiss.Zeitsch.d.Humboldt Univ.Berlin
Mat.nat. R XIX (197o)

Pappenheim, A.
Über die Stellung der akuten großzellig lymphozytären Leukämien im morphologischen System der Leukämien
Fol. haemat. 4 (19o7), 535

Ramsey, W.S.
Analysis of individual leucocyte behavior during chemotaxis
Exp. cell res. 7o (1972), 129

Ramsey, W.S.
Locomotion of human polymorphonulear leucocytes
Exp. cell res. (1972), 489

Rich, A.R.
Wintrobe, M.M.
Lewis, M.R.
The differentiation of myeloblasts from lymphoblasts by their manner of locomotion
Bull-Johns-Hopkins,Hops.65 (1939), 291

Richter, J.E. Die Auswertung cytologischer Forschungsfilme mit Hilfe der Teilbildanalyse
Res.Film 4 (1962), 3

Richter, J.E. Untersuchungen zur Cytodynamik kontinuierlich sichtbarer Zellen
Protoplasma LVIII (1964), 426

Rind, H.J. Atlas der Phasenkontrasthämatologie
Akademieverlag Berlin (1958)

Rind, H.J. Angewandte Phasenkontrasthämatolodie
Habilitationsschrift(Giessen), (1963)

Rosse, C. The morphologically and kinetically distinct populations of lymphoid cells in the bone marrow
Nature (London) 227 (197o), 73

Rosse, C. Lymphocyte production in the bone marrow
VI. Leucocyte Culture Conf.
Proc.Acad.Press (1972), 55

Senda, N.
Tamura,H. The mechanism of the movement of the leucocytes
Amp.Rep. 1 (1961), 126

Scherft, J.P. The locomotion of the cells of the lymphatic tissue in vitro (filmdemontrations)
Act.morphol.Neerlando-Scand.5 (1963), 289

Sharp, J.A.
Burwell, R.G. Interaction of macrophages and lymphocytes after Skin homografting or challange with soluble antigens
Motility of normal and leucemic human lymphocytes
J.lab.a.clin.med.61 (1963), 34

Stobbe, H. Bewegungsformen der Leukozyten, Phasenkontrastmikroskopische Studie
Med.Bild 6 (1963), 4o

Stockem, W.
Wohlfahrt-Bottermann, K.E.
Haberney, M.
Konturveränderungen und Faltungsgrad der Zelloberfläche von Amoeba proteus
Cytobiol. 1 (1969), 37

Trepel, F.
Rastetter, J.
Untersuchungen zur funktionellen Differenzierung der mononucleären Leukozyten
Blut 15 (1967), 76

Urasinski, J.
Habicht, W.
Zytophotometrische Bestimmungen des Nucleinsäuregehaltes mononucleärer Blutzellen
Fol.haemat. (Lpzg)94 (197o), 11

Wedekind, L.V.
Jorke, D.
Strahleninduzierte Veränderungen der Lymphoidzellen
Fol.haemat.91 (1969), 395

Yoffey, J.M.
Further problems of lymphocyte production
Am.N.Y.Acad.Sci. 113 (1964), 867

Yoffey, J.M.
Bone marrow in hypoxia and rebound
C.C. Thomas Puxbl.Sprinfield Illinois U.S.A. (1974)

Lebenslauf

Ich, Hans- Michael Sommer, wurde am 4.2.1943 in Helmstedt als Sohn des Arztes Dr.med.F.Sommer und seiner Ehefrau der Ärztin Dr.med.Elisabeth, geb. Fuhry, geboren. In Helmstedt besuchte ich dann auch die Grundschule sowiedas Gymnasium f. Jungen, an dem ich 1962 die Reifeprüfung ablegte. Im Anschluß daran leistete ich zwei Jahre Wehrdienst, bevor ich im Sommersemester 1964 das Medizinstudium an der Universität Hamburg begann. Nach fünf Semestern bestand ich das Physikum. Ich wechselte dann die Universität, und ging für ein Semester nach Innsbruck. Danach wechselte ich wieder zurück nach Hamburg, wo ich nach dem Sommersemester 1969 mein Staatsexamen bestand. Dann arbeitete ich als Med.-Assistent am Kreiskrankenhaus Helmstedt, nach Erteilung der Approbation begann ich meine Ausbildung zum Anästhesisten. Die Facharztanerkennung zum Anästhesisten wurde mir jetzt zum 16.4.1975 ausgesprochen. Ich bin seit Januar 197o mit meiner Frau, der Lehrerin Antje geb. Vasen, verheiratet, mit der ich zusammen drei Kinder habe.